

# Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo

First isolation of *Cryptococcus gattii* from the environment in the State of Espírito Santo

Ludmila de Matos Baltazar<sup>1</sup> e Mariceli Araújo Ribeiro<sup>1</sup>

## RESUMO

A presença de *Cryptococcus gattii* foi investigada em diferentes regiões do Estado do Espírito Santo. A maioria (73) das amostras foi coletada de árvores localizadas em lugares públicos de Vitória; 47 amostras foram coletadas de áreas preservadas ou ainda com pouco impacto humano, situadas nos arredores desta cidade, a altitudes entre 0 e 900m acima do nível do mar e 48 de árvores nativas das regiões norte e sul do estado. As amostras foram coletadas de ocos e troncos de árvores com auxílio de swab e resultaram em 2 (1,2%) isolados de *Cryptococcus neoformans*, 2 (1,2%) de *Cryptococcus gattii* e 1 (0,6%) de *Cryptococcus laurentii*. A espécie *Cryptococcus gattii* foi encontrada somente em árvores nativas da região norte, áreas que ainda apresentam resquícios de Floresta Atlântica, enquanto todas as amostras obtidas de vinte e duas espécies de árvores localizadas em área urbana não permitiram a detecção de *Cryptococcus gattii*. Esses resultados mostram uma possível relação entre ocorrência de Floresta Atlântica e *Cryptococcus gattii* e confirma que o meio ambiente é fonte de infecção desse fungo.

**Palavras-chaves:** *Cryptococcus gattii*. Meio ambiente. Árvores. Espírito Santo.

## ABSTRACT

The presence of *Cryptococcus gattii* was investigated in different regions of the State of Espírito Santo. The largest number (73) of samples was collected from trees located in public places in Vitória; 47 came from preserved areas or areas with only minor human impact, surrounding this city, at altitudes from 0 to 900m above sea level; 48 came from trees native of the northern and southern regions of the state. The samples were collected from tree hollows and trunks by of swabs and yielded two isolates (1.2%) of *Cryptococcus neoformans*, two (1.2%) of *Cryptococcus gattii* and one (0.6%) of *Cryptococcus laurentii*. The species *Cryptococcus gattii* was found only in native trees from the northern region, in areas that still have remains of the Atlantic Forest, while none of the samples from any of the 22 tree species located in urban areas was able to show the presence of *Cryptococcus gattii*. These results show a possible relationship between the presence of Atlantic Forest and occurrences of *Cryptococcus gattii*. They confirm that the environment is a source of infection with this fungus.

**Key-words:** *Cryptococcus gattii*. Environment. Trees. Espírito Santo.

O fungo basidiomiceto *Cryptococcus* apresenta duas espécies consideradas patogênicas para seres humanos e animais<sup>15,30</sup>, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, agentes etiológicos da criptococose, micose que afeta tanto indivíduos saudáveis<sup>25</sup>, como imunocomprometidos<sup>6,25</sup>, especialmente pacientes com AIDS<sup>4,25</sup>. A infecção é adquirida através da inalação de propágulos do fungo: leveduras desidratadas ou basidiósporos<sup>11,20</sup> e após a inalação pode haver disseminação hematogênica<sup>25</sup> para tecido cutâneo, órgãos internos e/ou sistema nervoso central, onde se observa a forma clínica mais comum da micose, a meningoencefalite<sup>25</sup>.

Ambas as espécies *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são capazes de produzir lacase, que permite a colonização da madeira, principalmente em avançado estado de decomposição<sup>12,21</sup>. Sua distribuição geográfica por muito tempo foi considerada restrita a regiões tropicais e subtropicais<sup>4,11,24,33</sup>. Entretanto, esse paradigma, atualmente, foi quebrado, uma vez que foi relatada a ocorrência de *Cryptococcus gattii* em regiões de clima temperado<sup>5,14,27,38,40</sup>. *Cryptococcus neoformans* por sua vez, ocorre geralmente em excrementos secos principalmente de pombos<sup>11,31</sup>.

1. Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

Apoio financeiro: Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado do Espírito Santo (FAPES), processo nº 30806665/2005.

**Endereço para correspondência:** Dra. Mariceli Araújo Ribeiro. Núcleo de Doenças Infecciosas/UFES. Av. Marechal Campos nº 1468, Maruípe, 29040-093 Vitória, ES.

Telefax: 55 27 3335-7498

e-mail: mariceliaraujo@yahoo.com

Recebido para publicação em 05/05/2008

Aceito em 01/09/2008

O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de *Cryptococcus gattii* em áreas da grande Vitória e em diferentes regiões do Estado do Espírito Santo.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Coleta das amostras.** No período de julho de 2005 a novembro de 2006, foram coletadas 168 amostras de oco e de casca de árvores. Os locais foram selecionados com base na observação de fatores de risco para a aquisição de *Cryptococcus gattii* pela população em geral: locais urbanos de Vitória com árvores ornamentais, além de regiões localizadas no Sul e no Norte do estado, com diferentes tipos de vegetação.

**Colheita e processamento das amostras.** As amostras foram obtidas com auxílio de swab, baseada na metodologia proposta por Granados & Castañeda<sup>11</sup>. No momento da colheita o swab, foi passado na superfície e nosocos das árvores e transferido para tubos, previamente identificados, contendo meio de transporte de Stuart (Difco). No laboratório, cada swab foi passado na superfície de 10 placas de ágar com semente de Níger<sup>11 37</sup> (*Guizotia abyssinica*), que foram incubadas por até cinco dias a 35°C.

**Isolamento e identificação das leveduras em nível de gênero e espécie.** Todas as colônias de coloração marrom no ágar Níger foram repicadas para ágar sabouraud dextrose (Difco). A identificação do gênero *Cryptococcus* foi baseada na detecção da enzima urease em Meio de Christensen (Difco), na ausência de fermentação de carboidratos e na assimilação obrigatória

de inositol como única fonte de carbono. Para caracterização das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* foi analisado o perfil de assimilação de carboidratos, a ausência de assimilação de nitrato como fonte de nitrogênio inorgânico e características micromorfológicas típicas, como a visualização de cápsula em preparação microscópica com tinta Nankin. As espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* foram diferenciadas no meio CGB (Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol)<sup>11 36</sup>.

## RESULTADOS

Do total de 168 amostras de árvores, 5 (3%) foram positivas para *Cryptococcus* spp, sendo 2 (1.2%) positivas para *Cryptococcus neoformans*, 2 (1.2%) para *Cryptococcus gattii* e uma (0.6%) para *Cryptococcus laurentii*. As amostras foram coletadas em oito áreas dentro da região metropolitana de Vitória, incluindo parques, horto e campi da UFES (73 amostras). Foram também incluídas duas áreas de preservação ambiental (15 amostras) localizadas respectivamente a 27 e 62km de Vitória: Reserva Biológica de Duas Bocas e Parque Estadual Paulo César Vinha, caracterizado por vegetação de restinga. Foram ainda selecionadas quatro localidades na região serrana (32 amostras), cerca de 80km de Vitória, além de três na região norte (32 amostras) e duas na região sul do estado (16 amostras). As duas cepas de *Cryptococcus gattii* foram isoladas apenas de árvores da região norte do estado, incluindo a reserva biológica de Sooretama (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 - Isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Brasil.

Local	Amostras positivas (%)	Total de amostras	Tipo de material vegetal	Referências
<b>Norte</b>				
Amazônia	-	-	oco de <i>Guettarda acreana</i>	Fortes e cols <sup>10</sup>
Piauí	9 (28,0%)	32	<i>Moquilea tomentosa</i> e duas da espécie <i>Cassia grandis</i>	Lazera e cols <sup>21</sup>
<b>Sudeste</b>				
Espírito Santo	0 (0,0%)	136	<i>Mangifera indica</i> (mangueira), <i>Cassia fistula</i> (cássia-imperial), <i>Licania tomentosa</i> (oiti), <i>Caesalpinia ferrea</i> (pau ferro), <i>Senna siamea</i> (cássia amarela), <i>Cassia ferruginea</i> (canafístula), <i>Tabebuia rosea</i> (ipê rosa), <i>Tabebuia impetiginosa</i> (ipê roxo), <i>Pinus</i> sp (pinheiro), <i>Bauhinia variegata</i> (unha-de-vaca), <i>Persea gratissima</i> (abacaterio), <i>Caesalpinia peltopboroides</i> (sibipiruna), <i>Cestrum nocturnum</i> (dama-da-noite), <i>Chorisia speciosa</i> (paineira rosa), <i>Caesalpinia echinata</i> (pau brasil), <i>Tibouchina granulosa</i> (quaresmeira), <i>Piptadenia colubrina</i> (angico branco), <i>Delonix regia</i> (flamboyant), <i>Ficus microcarpa</i> (figueira), <i>Tamarindus indica</i> (tamarindo), <i>Carica papaya</i> (pé-de-mamão), <i>Spondias mombin</i> (pé-de-cajá), troncos de árvores em decomposição, árvores de Ecossistemas Costeiros (Floresta de Restinga) e árvores de grande e médio porte da Floresta Atlântica	Presente estudo (Baltazar e Ribeiro)
Espírito Santo	2 (6,2%)	32	Árvores nativas de Mata Atlântica	Presente estudo (Baltazar e Ribeiro)
São Paulo	2 (8,3%)	24	detritos de <i>Eucalyptus</i> spp	Montenegro e cols <sup>27</sup>
<b>Sul</b>				
Rio Grande de Sul	13 (34,0%)	38	material fecal de pássaros	Abegg e cols <sup>1</sup>

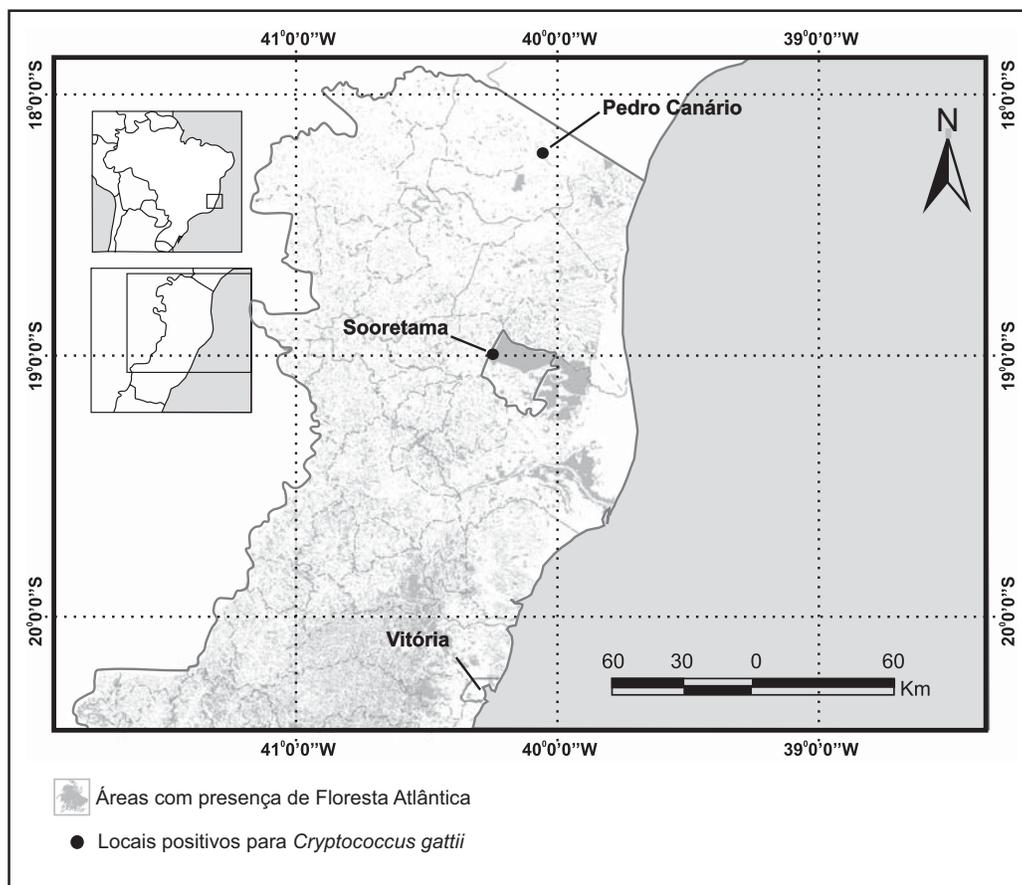


Figura 1 - Regiões do Estado do Espírito Santo de onde foram isoladas as cepas *Cryptococcus gattii*.

## DISCUSSÃO

Por muito tempo a espécie *Cryptococcus gattii* foi estritamente associada a árvores de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*)<sup>8</sup> e a climas tropicais e subtropicais<sup>2,27,33,39,40</sup>. Atualmente, entretanto, esta espécie tem sido encontrada em diferentes árvores e regiões geográficas (Tabela 2).

No Brasil, a espécie foi encontrada nas regiões Norte, Sul e Sudeste<sup>1, 10, 21, 27</sup>, embora sua maior frequência seja na região Norte<sup>27</sup>. Além de árvores, outros nichos de *Cryptococcus gattii* no ambiente também estão sendo detectados, como o achado desta espécie em excrementos de pássaros psitacídeos de cativeiro, em zoológico do Rio Grande do Sul<sup>1</sup> (Tabela 1).

Neste estudo, um total de 22 espécies de árvores ornamentais e frutíferas foram identificadas, mas o isolamento do fungo não ocorreu nestes vegetais, indicando, como salienta Randhawa e cols<sup>28</sup>, que a espécie pode ter distribuição muito generalizada, o que dificulta sua detecção na natureza. A espécie *Cryptococcus gattii* foi isolada de árvores existentes apenas nas regiões de Floresta Atlântica e, que por não apresentarem nomes populares nem estruturas como flores e frutos (informações imprescindíveis para a identificação de gimnospermas e angiospermas) não foi possível estabelecer as espécies destas árvores. Além disto, a cepa isolada em Pedro Canário foi coletada de uma árvore em adiantado estado de decomposição. Nenhuma espécie de *Cryptococcus* foi

isolada de eucaliptos (mencionada anteriormente na literatura como a principal fonte de *Cryptococcus gattii*<sup>5,27,29</sup>), coincidindo com achados no Canadá<sup>14</sup> e outras regiões<sup>3, 11, 12, 14, 16, 21, 30</sup>, e demonstrando que o eucalipto não é o nicho ecológico único e primário dessa espécie<sup>14, 21, 40</sup>.

A baixa ocorrência de *Cryptococcus gattii* no Espírito Santo confirma os dados de outros estudos, onde a espécie tem sido isolada do meio ambiente em porcentagem menor que *Cryptococcus neoformans*<sup>23, 28</sup>. Nas regiões sul, sudeste e centro-oeste o isolamento de *Cryptococcus gattii* do ambiente é raro quando comparado a *Cryptococcus neoformans* (90,2% e 1,9%, respectivamente)<sup>28</sup>. No entanto, esta espécie tem sido mais prevalente nas regiões norte e nordeste (62%)<sup>28</sup>. Observa-se que mais de 50% das amostras foram coletadas de árvores presentes na região metropolitana de Vitória e em nenhuma delas foi encontrado *Cryptococcus gattii*, evidenciando que as condições climáticas de Vitória, cidade litorânea e com temperaturas médias elevadas, não são propícias para a ocorrência do fungo. Da mesma forma, *Cryptococcus gattii* não foi encontrado no Parque Estadual Paulo César Vinha, caracterizado por apresentar vegetação de restinga.

As amostras positivas para *Cryptococcus gattii*, foram procedentes de Sooretama e Pedro Canário, regiões localizadas ao norte do estado. Sooretama é uma região marcada pela presença de Floresta Atlântica, tanto próxima como afastada dos

Tabela 2 - Isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* em diferentes regiões geográficas do mundo.

País	Amostras positivas (%)	Total de amostras	Tipo de material vegetal	Referências
<b>Oceania</b>				
Austrália	3 (30,0%)	10	<i>Syncarpia glomulifera</i> e outra árvore não identificada	Vilcins e cols <sup>40</sup>
<b>Ásia</b>				
Índia	5 (1,3%)	368	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Eucalyptus citriodora</i> e <i>Eucalyptus tereticornis</i>	Chakrabarti e cols <sup>5</sup>
Índia	7 (10,6%)	66	<i>Syzygium cumini</i> e <i>Ficus religiosa</i>	Randhawa e cols <sup>32</sup>
Índia	10 (6,7%)	148	oco de <i>Mangifera indica</i> , <i>Tamarindus indica</i> , <i>Pithecolobium dulce</i> e tronco de <i>Syzygium cumini</i>	Grover e cols <sup>12</sup>
Jordânia	0 (0,0%)	500	-	Hamasha e cols <sup>13</sup>
Egito	3 (1,2%)	245	flor de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Mahmoud e cols <sup>23</sup>
<b>Europa</b>				
Itália	-	-	detritos de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Montagna e cols <sup>26</sup>
<b>América de Norte</b>				
Canadá	58 (0,8%)	732	<i>Alluns</i> spp, <i>Cedrus</i> spp, <i>Pseudotsuga</i> spp e outras não identificadas	Kidd e cols <sup>14</sup>
Canadá	519 (9,0%)	5.704	material de árvores, solo, ar, água potável, água do mar	Kidd e cols <sup>16</sup>
Estados Unidos	-	-	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Pfeiffer e cols <sup>29</sup>
<b>América Central</b>				
México	7 (28,0%)	25	detritos (tronco, folhas e solo) de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	Licea e cols <sup>22</sup>
<b>América do Sul</b>				
Colômbia	2 (3,0%)	68	detritos de <i>Terminalia catappa</i>	Callejas e cols <sup>3</sup>
Colômbia	-	-	tronco e amostras do solo de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Gramados e cols <sup>11</sup>
Colômbia	57 (2,0%)	2.816	<i>Eucalyptus</i> spp, <i>Laurus</i> spp	Escandon e cols <sup>9</sup>
Argentina	2 (2,0%)	100	<i>Eucalyptos</i> spp	Davel e cols <sup>7</sup>

centros populacionais. A Floresta Atlântica é caracterizada por ter árvores antigas, elevada umidade e sombreamento<sup>34</sup> e parece ser um ambiente propício para a ocorrência de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. Já Pedro Canário, é uma região caracterizada por desmatamentos recentes, mas que ainda resguarda resquícios de Floresta Atlântica. Possui também árvores em avançado estado de decomposição, condição que favorece o isolamento de *Cryptococcus gattii*<sup>28,31</sup>.

Nossos resultados parecem demonstrar que *Cryptococcus gattii* preferencialmente ocorre em árvores nativas e localizadas em regiões ainda sem muita interferência humana, como sugerido por outros autores<sup>28</sup>.

Neste estudo, foi possível a detecção de três espécies de *Cryptococcus*: *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii*. Morfológicamente, as células das três espécies apresentaram cápsula, visualizadas ao microscópio óptico com tinta Nankin. É importante salientar a necessidade de se realizar testes de assimilação de carboidratos, além do emprego do meio CGB, pois *Cryptococcus laurentii* pode ter o mesmo padrão de crescimento de *Cryptococcus gattii* neste meio e deve ser diferenciado pela assimilação positiva da lactose<sup>20</sup>.

A detecção de *Cryptococcus laurentii* em material de árvore é um dado importante. Esta espécie tem sido encontrada em outros estados do Brasil<sup>17, 27</sup> e pode ocasionalmente infectar também seres humanos<sup>18,19,35</sup>.

Este estudo mostra a ocorrência de *Cryptococcus gattii* no norte do Espírito Santo e sua possível associação com microclima presente em Floresta Atlântica desta região. Outros estudos, no

entanto, devem ser realizados para se estabelecer quais fatores podem estar diretamente relacionados à ocorrência do fungo no ambiente.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos a Claudiney Biral Santos, funcionário do Núcleo de Entomologia da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) no auxílio na colheita de amostras fora da grande Vitória.

## REFERÊNCIAS

1. Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia* 161:83-91, 2006.
2. Cafarchia C, Romito D, Iatta R, Camarda A, Montagna MT, Otranto D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Medical Mycology* 44:485-492, 2006.
3. Callejas A, Ordoñez N, Rodriguez MC, Castañeda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Medical Mycology* 36: 341-344,1998.
4. Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* 3:405-415, 2003.
5. Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye AA. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *Journal of Clinical Microbiology* 35:3340-3342, 1997.
6. Darzé C, Lucena R, Gomes I, Melo A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33: 21-26, 2000.

7. Davel G, Abrantes R, Brudny M, Córdoba S, Rodero L, Canteros CE, Perrotta D. Primer aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans* var *gattii* en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 35:110-112, 2003.
8. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1642-1644, 1990.
9. Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* 6:625-635, 2006.
10. Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 44:137-140, 2001.
11. Granados DP, Castañeda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microbial Ecology* 49:282-290, 2005.
12. Grover N, Nawange SR, Naidu J, Singh SM, Sharma A. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopathologia* 164:159-170, 2007.
13. Hamasha AM, Yildiran ST, Gonlum A, Saracli MA, Doganci L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia* 158:195-199, 2004.
14. Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JW, Bartlett KH. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1433-1443, 2007.
15. Kidd SE, Guo H, Bartlett KH, Xu J, Kronstad JW. Comparative gene genealogies indicate that two clonal lineages of *Cryptococcus gattii* in British Columbia resemble strains from other geographical areas. *Eukaryotic Cell* 4:1629-1638, 2005.
16. Kidd SE, Hagen E, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:17258-17263, 2004.
17. Kobayashi CC, Souza LK, Fernandes OF, Brito SC, Silva AC, Sousa ED, Silva MR. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47: 203-207, 2005.
18. Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, Legakis NJ. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidos* cryptococcaemia in AIDS patients. *Medical Mycology* 36:335-339, 1998.
19. Kunova A, Krcmery V. Fungaemia due to thermophilic cryptococci: 3 cases of *Cryptococcus laurentii* bloodstream infections in cancer patients receiving antifungals. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 31:328-331, 1999.
20. Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeast: A taxonomic study*. Elsevier Science New York, 1998.
21. Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AF, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 38:379-383, 2000.
22. Licea BA, Garza DG, Zuniga MT. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* var *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Revista Iberoamericana Mycologia* 13: 27-28, 1996.
23. Mahmoud YA. First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var *gattii* from the Gharbia Governorate, Egypt. *Mycopathologia* 148: 83-86, 1999.
24. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E; IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases* 9:189-195, 2003.
25. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 515-458, 1995.
26. Montagna MT, Viviani MA, Pulito A, Aralla C, Tortorano AM, Fiore L, Barbuti S. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in Italy. *Journal of Mycology Medical* 7: 93-96, 1997.
27. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Medical Mycology* 38:385-390, 2000.
28. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, Bezerra CC, Pérez MA, Cardarelli P, Wanke B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 41:73-77, 2003.
29. Pfeiffer T, Ellis D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans gattii* from California. *The Journal Infectious Diseases* 163: 929-930, 1991.
30. Polacheck I, Platt Y, Aronovitch J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 58:2919-2922, 1990.
31. Randhawa HS, Mussa AY, Khan ZU. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. *Mycopathologia* 151:63-69, 2001.
32. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 41:199-209, 2003.
33. Randhawa HS, Kowshik T, Preeti Sinha K, Chowdhary A, Khan ZU, Yan Z, Xu J, Kumar A. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Medical Mycology* 44:623-630, 2006.
34. Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
35. Ritterband DC, Seedor JA, Shah MK, Waheed S, Schorr I. A unique case of *Cryptococcus laurentii* keratitis spread by a rigid gas permeable contact lens in a patient with onychomycosis. *Cornea* 17:115-118, 1998.
36. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology* 39: 155-168, 2001.
37. Staib F, Schultz-Dieterich J. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages - control of *Cryptococcus neoformans* habitats. *Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene* 179: 179-186, 1984.
38. Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal* 43: 792-794, 2002.
39. Tay ST, Lim HC, Tajuddin TH, Rohani MY, Hamimah H, Thong KL. Determination of molecular types and genetic heterogeneity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Malaysia. *Medical Mycology* 44:617-622, 2006.
40. Vilcins I, Krockenberger M, Agus H, Carter D. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. *Medical Mycology* 40:53-60, 2002.