

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DE UMA
MADEIREIRA E SUA CORRELAÇÃO COM UM CASO CLÍNICO
DE CRIPTOCOCOSE**

Dissertação de Mestrado

JULIANA CRESTANI

Porto Alegre, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Isolamento e Caracterização de Leveduras de uma Madeireira e
sua Correlação com um Caso Clínico de Criptococose

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Juliana Crestani

Orientadora: Prof^a Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A Deus, pois se cheguei até aqui foi porque Ele estava ao meu lado me guiando e protegendo.

Aos meus pais José e Lourdes pelo amor, carinho, dedicação, apoio e compreensão dados a mim em toda minha vida. Pela presença constante, mesmo longe. Amo vocês de um jeito inexplicável, amor de alma!!!

Aos meus irmãos Eliete, Ilene, Alex e ao meu sobrinho Alex Junior simplesmente por existirem e estarem sempre ao meu lado. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Marilene Vainstein, pela oportunidade e confiança, mesmo sem me conhecer. Pela orientação, apoio e sugestões dadas para meu crescimento profissional e também pessoal.

Aos professores, Arnaldo Zaha e Augusto Schrank, membros da comissão de acompanhamento, pelas sugestões e pelo aprendizado disponibilizado.

A professora Irene Schrank, relatora da dissertação, pela atenção e pelas sugestões.

As pessoas que confiaram a nós o caso clínico, que foi a base para o desenvolvimento desse trabalho. Esperamos ter alcançado o que desejavam.

Aos funcionários da esterilização, em especial ao Sr. Milton, por ser essa pessoa maravilhosa, e pela ajuda constante.

Aos secretários da Pós-graduação, Silvia e Luciano, pela disponibilidade e atenção.

Aos colegas dos laboratórios 218 e 220 pela convivência e aprendizado, em especial a Letícia, Irina, Lívia e Roberta pela amizade e confiança em mim depositadas; ao Alexandre pela disponibilidade e ensinamentos em toda parte de taxonomia de leveduras, a Josiane pelo auxílio na parte de sequenciamento e ao Felipe pelo companheirismo dentro e fora do laboratório por quase dois anos.

Aos colegas do laboratório 217 pela disponibilidade constante, em especial a Caru pela grande amizade; a Lis, ao Juliano e ao Charley pela paciência e amizade.

Aos demais colegas do PPGBCM, pelo convívio e auxílio nesses dois anos. A CAPES, pela bolsa de auxílio.

Ao Marcelo Matsumoto e a Dr^a Maria José Soares Mendes Giannini, pelo auxílio com os testes de suscetibilidade.

A todos que de uma ou de outra forma participaram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
JUSTIFICATIVA	1
CAPÍTULO I - RELATO DE CASO CLÍNICO	3
CAPÍTULO II – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>C. neoformans</i> E/OU <i>C. gattii</i>	10
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Morfologia e Identificação	10
1.2 Ecologia e Epidemiologia	12
1.3 Criptococose	13
1.4 Fatores de Patogenicidade	15
1.5 Ciclo sexual	16
1.6 Aspectos moleculares	17
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Coleta das amostras	19
3.2 Processamento das amostras	19
3.3 Isolamento e Caracterização de <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	20
3.3.1 Isolamento de <i>C. neoformans</i> / <i>C.gattii</i>	20
3.3.2 Caracterização Bioquímica	20
3.3.2.1 Atividade de Urease	20
3.3.2.2 Visualização da presença de cápsula	21
3.3.2.3 Agar CGB	21
3.3.3 Caracterização Molecular	21
3.3.3.1 Extração de DNA	21
3.3.3.2 PCR para diferenciação das espécies	22
3.3.3.3 PCR <i>fingerprinting</i>	22
3.3.3.4 PCR para determinação dos mating type “a” e “α”	23
3.3.4 Suscetibilidade a antifúngicos	24

3.3.4.1 Antifúngicos e técnica utilizada	24
3.3.4.2 Diluições das drogas e inóculos	24
3.3.4.3 Critérios para Leitura	26
3.4 Meios de Cultivo e Soluções	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Identificação Morfológica e Bioquímica	27
4.2 Caracterização Molecular	28
4.3 Suscetibilidade a Antifúngicos	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO	46
CAPITULO III – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE OUTRAS	47
LEVEDURAS	
1 INTRODUÇÃO	47
1.1 Leveduras	47
1.2 Micoses emergentes	48
2 OBJETIVOS	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Coleta das amostras	51
3.2 Processamento das amostras	51
3.3 Isolamento e identificação das leveduras ambientais	52
3.3.1 Isolamento e Manutenção das culturas	52
3.3.2 Caracterização morfológica	52
3.3.3 Caracterização Bioquímica	53
3.3.3.1 Testes de Fermentação	54
3.3.3.2 Testes de Assimilação de Fontes de Carbono	55
3.3.3.3 Testes de Assimilação de Fontes de Nitrogênio	55
3.3.3.4 Atividade de Urease	56
3.3.3.5 Produção de Caseinase	56
3.3.4 Caracterização Fisiológica	56
3.3.4.1 Teste de Crescimento em Diferentes Temperaturas	57
3.3.4.2 Teste de Crescimento a Alta Pressão Osmótica	57
3.3.5 Identificação Molecular	57
3.3.5.1 Extração de DNA e Amplificação da região D1/D2	57

3.3.5.2 Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA	58
3.4 Meios de Cultivo e Soluções	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Isolamento e purificação das culturas	60
4.2 Identificação Fenotípica das leveduras isoladas	61
4.3 Espécies de leveduras com caso clínico descrito	63
4.4. Identificação Molecular	64
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	74
APENDICES	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
Aids	Acquired immunodeficiency syndrome
CGB	Canavanina, glicina e azul de bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
dNTP	deoxiribonucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
g	grama
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glicuronoxilomanana
h	horas
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HIV	Human Immunodeficiency Virus
kg	kilograma
L	litro
M	molar
MATa	Mating type a
MAT α	Mating type alfa
Mb	megabases
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
nm	nanômetros
°C	graus Celsius
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
spp.	espécies
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano

YCB	Yeast Carbon Base
YNB	Yeast Nitrogen Base
U	unidades
UV	ultravioleta
V	volume
var.	variedade
λ	lambda
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micromolar

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figure 1 Magnetic resonance imaging scan. Coronal view (left) and axial view (right) of the brain showing cryptococcal lesions. 9

Capítulo II

- Figura 1 Características avaliadas na identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*. 11
- Figura 2 Ciclo infeccioso da criptococose. 14
- Figura 3 Diferenciação molecular das espécies *C. neoformans*/ *C. gattii*. 28
- Figura 4 PCR *fingerprinting* para identificação dos tipos moleculares das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. 29

Capítulo III

- Figura 1 Representação dos isolados pertencentes as Filo Basidiomycota. 62
- Figura 2 Representação dos isolados pertencentes as Filo Ascomycota. 62

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1	Meios de cultivo e soluções empregados para realização dos testes.	26
Tabela 2	Resultados obtidos pela caracterização bioquímica e morfológica dos isolados no estudo.	27
Tabela 3	Padrão de suscetibilidade a antifúngicos apresentado pelos isolados do estudo.	29

Capítulo III

Tabela 1	Meios de cultivo e soluções empregados para realização dos testes.	59
Tabela 2	Descrição do número amostral em relação ao número de leveduras isoladas em cada sítio.	60
Tabela 3	Relação dos gêneros isolados em cada estação do ano.	61
Tabela 4	Espécies com relato de caso clínico na literatura.	63
Tabela 5	Linhagens de leveduras seqüenciadas e analisadas até o momento.	65

RESUMO

A incidência de micoses tem aumentado drasticamente, representando a maioria de infecções oportunistas. As leveduras vêm se destacando pelo modo ao qual infectam o hospedeiro, por suas defesas contra o sistema imune dos hospedeiros e por serem amplamente distribuídas no ambiente. A criptococose é a terceira mais freqüente infecção em indivíduos HIV-positivos e atualmente o número de casos em pessoas ditas “aparentemente imunocompetentes” vem aumentando drasticamente. Os agentes etiológicos são ambas as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A infecção humana se dá pela inalação de propágulos infectivos de um sítio ambiental. Nesse estudo, nós relatamos um caso de criptococose disseminada em um indivíduo de 66 anos, do sexo masculino, HIV-negativo, o qual residia e trabalhava em uma Madeireira na cidade de Cachoeira do Sul – RS. O diagnóstico inicial foi realizado por biópsia de um nódulo subcutâneo e posteriormente foi realizada a confirmação da disseminação da doença através de Raio-X pulmonar e Ressonância Magnética Cerebral. Com base nesse caso clínico, foi proposto isolar os agentes causais da criptococose e outras leveduras dessa Madeireira. As leveduras foram isoladas para caracterizar a microbiota leveduriforme desse local e avaliar a que outras micoses emergentes os trabalhadores dessa Madeireira estão expostos. Foram coletadas amostras de monitoramento do ar, excretas de pombos e galinhas, serragem, pó de madeira, poeira, cascas e folhas de árvores do gênero *Eucaliptus*. As amostras foram coletadas das quatro vezes no período de um ano (2005), sendo realizadas uma coleta por estação do ano. As amostras coletadas totalizaram 40 sítios amostrais do ar interno da madeireira, 40 amostras de excretas (pombos e galinhas) e 63 amostras no interior da madeireira (serragem, pó de madeira, poeira, casca de eucalipto e folha de eucalipto). De alguns desses sítios amostrais foram obtidos três isolados de *C. neoformans* var. *grubii*, um isolado de *C. gattii* e 180 leveduras. Dentre as leveduras, foram identificados 7 diferentes gêneros do Filo Basidiomycota e 10 pertencentes ao Filo Ascomycota. Dentre as espécies de leveduras identificadas, algumas são patógenos, porém a maioria é saprofítica. Os gêneros prevalentes são: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Pichia*. Estudos no ambiente doméstico de indivíduos infectados podem sugerir medidas profiláticas pelo conhecimento dos patógenos aos quais eles estão expostos.

JUSTIFICATIVA

A família de um homem HIV-negativo, aparentemente imunocompetente, com quadro clínico avançado de meningoencefalite por *Cryptococcus*, procurou auxílio no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica – UFRGS para posteriores investigações a cerca do caso. O paciente residia e trabalhava no interior de uma Madeireira, na cidade de Cachoeira do Sul - RS, um nicho sugestivo para ambas as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Como a forma de infecção da doença se dá por inalação de propágulos infectivos do fungo, a preocupação da família era de uma possível infecção de outro trabalhador nesse local.

A criptococose é a terceira mais freqüente infecção em indivíduos HIV - positivos (DEL VALLE & PINA-OVIEDO, 2006) e atualmente o número de casos em indivíduos ditos “aparentemente imunocompetentes” vem aumentando drasticamente (LUI *et al.*, 2006). A doença é caracterizada por quadros brandos de infecção pulmonar, que se não tratados evoluem para quadros de meningoencefalite. A infecção se dá por inalação de propágulos infectivos, os quais chegam aos pulmões e iniciam o ciclo infeccioso (LIN & HEITMAN, 2006). As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são agentes etiológicos da criptococose, apresentando particularidades no estabelecimento da doença e na escolha dos indivíduos acometidos. *C. neoformans* var. *grubii* e var. *neoformans* são considerados patógenos oportunistas, pois infectam preferencialmente pacientes imunocomprometidos; já *C. gattii* é considerado patógeno primário, por infectar principalmente indivíduos imunocompetentes.

Atualmente sabe-se que essas espécies fúngicas apresentam distribuição universal, com nichos preferenciais, porém não específicos. A espécie *C. neoformans* é mais frequentemente isolada em excretas de pombos e de outras aves como galinhas, papagaios, codornas, e outras; já *C. gattii* geralmente é isolado de árvores do gênero *Eucalyptus* e outras ornamentais, como *Ipe*, *Hibiscus*, *Cassia*, *Ficus* (LAZERA *et al.*, 2000; NISHIKAWA *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2005; ABEGG *et al.*, 2006).

Este trabalho foi desenvolvido com base em um caso clínico de criptococose em individuo imunocompetente, visando obter dados sobre a

origem da infecção da criptococose e sobre outras doenças fúngicas as quais os trabalhadores dessa Madeireira estão expostos.

REFERÊNCIAS

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v. 161, p. 83 – 91, 2006.

DEL VALLE, L. & PINA-OVIEDO, S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. **Front Biosci**, v. 11, p. 718–32, 2006.

KOBAYASHI, C.C.B.A.; SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O.F.L.; BRITO, S.C.A.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.R.R. Characterization Of *Cryptococcus neoformans* Isolated From Urban Environmental Sources In Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.47, p. 203 – 207, 2005.

LAZERA, M.S.; SALMITO CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**, v. 38, p. 379 – 383, 2000.

LIN, X. & HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69 – 105, 2006.

LUI, G.; LEE, N.; IP, M.; CHOI, K.W.; TSO, Y.K.; LAM, E.; CHAU, S.; LAI, R.; COCHRAN, C.S. Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients. **Q J Med**, v. 99, p. 143 – 151, 2006.

NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, L.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PEREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 73 - 77, 2003.

CAPÍTULO I - RELATO DE CASO CLÍNICO

Disseminated cryptococcosis in an immunocompetent patient from Southern Brazil

Juliana Crestani ¹, Ricardo de Freitas Zwirtes ², Letícia Silveira Goulart ¹, Livia Kmetzsch Rosa e Silva ¹, Marilene Vainstein ^{1*}

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005 CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Hospital Universitário de Santa Maria – Serviço de Doenças Infecciosas, CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Correspondence author: Marilene Vainstein at Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005 CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 (51) 3316-6060; Fax +55 (51) 3316-7309. e-mail:

mhv@cbiot.ufrgs.br

Abstract

We report a case study of an apparently immunocompetent patient who has developed meningoencephalitis caused by *Cryptococcus* sp. The patient worked and lived in a timber factory, a natural niche for *Cryptococcus* spp that naturally inhabits trees trunks and leaves.

Key words: cryptococcosis; immunocompetent hosts; *C. neoformans*; *C. gattii*

Introduction

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are etiological agents of cryptococcosis, a systemic and opportunistic fungal infection, which if not treated may lead to the patient's death (1). *C. neoformans* is cosmopolitan yeast found in soil, house dust, and from the excrements of a variety of avian

species. It is commonly associated with infections in immunocompromised patients, such as HIV-infected, cancer treated and organ transplanted individuals. *C. gattii* has been isolated from a variety of tree species and is a primary pathogen affecting predominantly immunocompetent hosts, but it has also been increasingly associated with immunocompromised patients (2-6).

Cryptococcosis is thought to be acquired by inhalation of airborne propagules, basidiospores or desiccated yeasts that colonize the host respiratory tract without producing any disease. The pulmonary infection is commonly asymptomatic and can be disseminated hematogenously to cause systemic infection. Meningoencephalitis is the most common clinical form of this disease and the host immune status may affect disease dissemination (7). With the increasing use of immunosuppressant worldwide and with the highly active antiretroviral therapy (HAART) era, non-HIV-infected individuals may become the predominant infected group, including the “apparently immunocompetent” patients (without predisposing factors) (8,9). The treatment of cryptococcosis is based in alternates doses of amphotericin B, with or without the addition of 5-flucytosine (depending upon the patient’s history), tracked by a following up with fluconazole until the patient is cured, or for unlimited time, in cases of HIV-infected patients.

We report a case of disseminated cryptococcosis in an apparently immunocompetent patient, who worked and lives in a timber factory. In addition, we present review over the current topics evolving cryptococcosis in immunocompetent patients holding both fungal species.

Case Report

A 66-year-old male was admitted in the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) in March 2005 with a two month history of shaking, sensorial alterations, walking difficulties and dribbling. In addition he had a cutaneous nodule in his scalp, which by biopsy confirmed diagnosis for cutaneous cryptococcosis and was initially given fluconazole therapy (400mg a day) for 12 weeks, but in 5 weeks with therapy, brain and lungs cryptococcoma were found by magnetic resonance (Figure 1) and chest x-ray respectively. The

patient was diagnosed with disseminated cryptococcosis in the HUSM and the antifungal therapy was initiated.

On questioning, the patient denied smoking or alcohol abuse. Examinations reported that the patient was non-HIV-infected, did not react for hepatitis B and C or neurosifilis, but indicated relatively high levels of protein C in his organism, suggesting an active infection process. He was initially given intravenous amphotericin B therapy for 4 weeks (0,7mg/kg/day a final dose of 2000mg). Twelve months' oral fluconazole therapy (400mg a day) was planned. The patient was re-examined two months after amphotericin B therapy and a reduction on the brain lesions was observed. After one year, the persistent brain nodule lesion did not disappear and treatment with fluconazole (400mg a day) was reinstated.

Discussion

Cryptococcosis is the most common fungal infection of the central nervous system (CNS) and the third most frequent neurological complication in HIV-infected patients (10). With the emergence of HAART era and the increasing use of immunosuppressants, cryptococcosis in apparently immunocompetent individuals may become predominant. Apparently immunocompetent individuals do not present apparent predisposing factors, which generally lead to a delayed diagnosis. They present more intense inflammation, fungaemia is infrequent, and clinical outcomes are more satisfactory (9). The case reported in this work illustrates this real of situation, where initially the patient revealed no predisposing factors, such AIDS, cancer treatment, smoke or alcoholism. Before admitted in the HUSM, he was given fluconazole therapy for 5 weeks because of a diagnosis for cutaneous cryptococcosis, which in immunocompetent patients is a rare manifestation of the disease, and may be one of the first manifestations of disseminated cryptococcosis (11).

The treatment for cryptococcosis involving apparently immunocompetent individuals has not yet been fully identified. The protocol for immunocompromised host HIV-negative or HIV-infected and apparently immunocompetent is identical, with amphotericin B, with or without 5-

flucytosine, followed by prolonged oral fluconazole for the complete cure (12). In this report, the patient remains in therapy with fluconazole after twelve months, but chest computed tomography revealed a persistent brain lesion (data not show). Amphotericin B therapy again will be administrated for disappears this lesion.

The patient worked and lived in a timber factory, a natural niche for the species *C. neoformans* or *C. gattii*. This fungal species have been sampled worldwide in recent years. *C. neoformans* has been isolated commonly from drooping of various avian species, air, soil, swabs from trees and in some cases in dust of houses (13,14). Most of the isolates *C. gattii* are from eucalyptus trees, but they have been found in several new species of trees and in some cases excreta of birds (15-18). Thus, *C. neoformans* and *C. gattii* could share the same natural niche (13).

New studies will be necessary at the work and living sites of the patient to evaluate the potential risk people are being exposed and propose preventive ways for the disease.

References

- 1 Speed B, Dunt D. Clinical and Host Differences Between Infections with the 2 Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 1995 Jul;21(1):28-34.
- 2 Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, *et al*. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Dec 7;101(49):17258-63.
- 3 Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, *et al*. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 2003 Jan;41(1):73-7.

- 4 Colom MF, Frases S, Ferrer C, *et al.* First local case of human cryptococcosis in Spain caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Rev Iberoam Micol* 2003 Dec;20(4):181.
- 5 Peachey PR, Gubbins PO, Martin RE. The association between cryptococcal variety and immunocompetent and immunocompromised hosts. *Pharmacotherapy* 1998 Mar;18(2):255-64.
- 6 Medeiros Ribeiro A, Silva LK, Silveira Schrank I, *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. *Med Mycol* 2006 Dec; 44(8):707 – 13.
- 7 Lin X, Heitman J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annu Rev Microbiol* 2006;60:69-105.
- 8 Friedman GD, Fessel J, Udaltsova N, Hurley LB. Smoking and cryptococcosis in AIDS patients. *Mycoses* 2006 Jan;49(1):68-9.
- 9 Lui G, Lee N, Ip M, *et al.* Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients. *QJM* 2006 Mar;99(3):143-51.
- 10 Del VL, Pina-Oviedo S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Front Biosci* 2006;11:718-32.
- 11 Dora JM, Kelbert S, Deutschendorf C, *et al.* Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in immunocompetent hosts: case report and review. *Mycopathologia* 2006 Apr;161(4):235-8.
- 12 Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, *et al.* Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000 Apr;30(4):710-8.

- 13 Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles *et al.* Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 2000 Oct;38(5):379-83.
- 14 Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. *Med Mycol* 2005 Feb;43(1):67-71.
- 15 Lazera MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*—evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med Mycol* 1998 Apr;36(2):119-22.
- 16 Chen SC, Currie BJ, Campbell HM, *et al.* *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in northern Australia: existence of an environmental source other than known host eucalypts. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997 Sep;91(5):547-50.
- 17 Huerfano S, Castaneda A, Castaneda E. Experimental infection of almond trees seedlings (*Terminalia catappa*) with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C. *Rev Iberoam Micol* 2001 Sep;18(3):131-2.
- 18 Abegg MA, Cella FL, Faganello J, *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia* 2006 Feb;161(2):83-91.

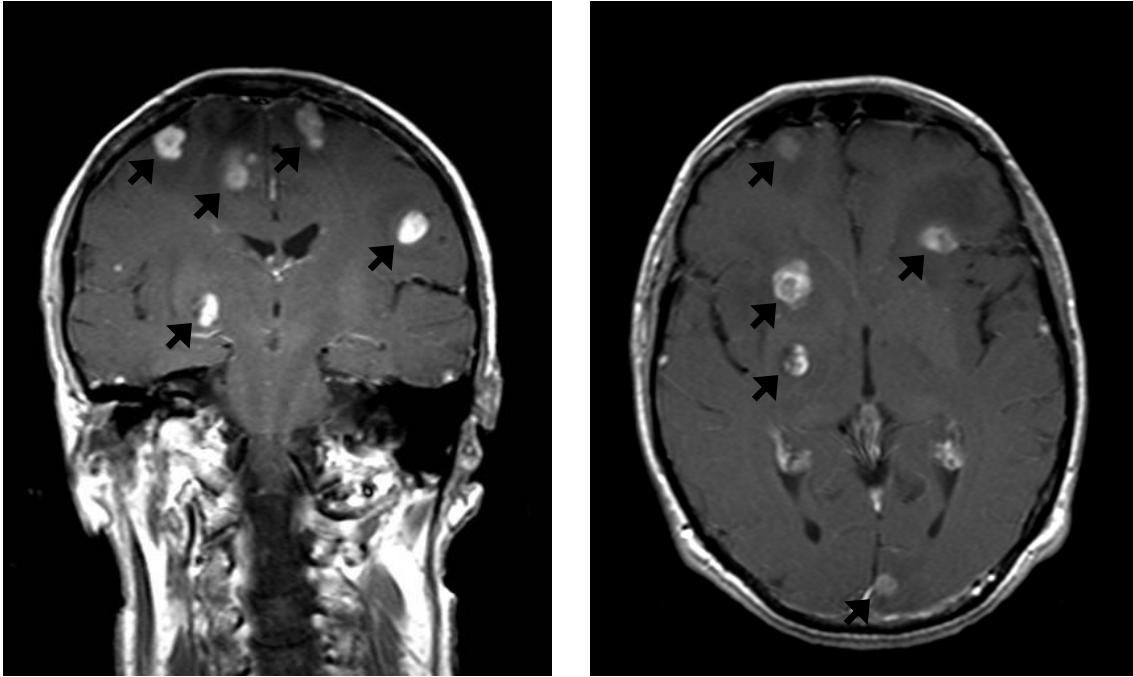


Figure 1. Magnetic resonance imaging scan. Coronal view (left) and axial view (right) of the brain showing cryptococcal lesions.

CAPÍTULO II – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *C. neoformans* E/OU *C. gattii*

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptococcus* compreende atualmente 34 espécies caracterizadas como leveduras com brotamento, variavelmente encapsuladas. Dessas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são consideradas de maior interesse clínico, pois são agentes etiológicos da criptococose, uma doença sistêmica e oportunista que se não tratada leva a óbito. As espécies possuem uma cápsula polissacarídica, a qual possui antígenos em sua superfície. Esses antígenos dividem as espécies em sorotipos, que são: sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*), sorotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*), sorotipo B (*C. gattii*), sorotipo C (*C. gattii*) e o sorotipo híbrido AD. Essa divisão é importante para diferenciação das variedades da espécie *C. neoformans*, as quais possuem particularidades tanto na distribuição, como na doença que causam. *C. gattii* possui distintos sorotipos sem divisão em variedades, apesar dos mesmos apresentarem diferenças na distribuição e na doença (CASADEVALL & PERFECT, 1998; LIN & HEITMAN, 2006).

1.1 Morfologia e Identificação

C. neoformans e *C. gattii* caracterizam-se por serem leveduras encapsuladas, ovóides ou arredondadas, que apresentam brotamento. Podem medir de 4 a 10 μm , e sua cápsula polissacarídica pode alcançar o tamanho de 30 μm ou mais quando cultivada em laboratório; no ambiente natural são pequenos e pobres de cápsula podendo vir a serem acapsulados (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

A identificação das espécies se dá primeiramente pela confirmação da produção de melanina (LI & WU, 1995), geralmente avaliada no cultivo em Agar Níger, o qual possui compostos fenólicos que são convertidos à melanina

pela ação da enzima lacase, produzida pelo fungo. Uma prova fisiológica da presença da enzima urease, em Agar uréia de Christensen é necessária para confirmação, juntamente com a visualização microscópica da cápsula polissacarídica, por coloração negativa em tinta nanquim (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

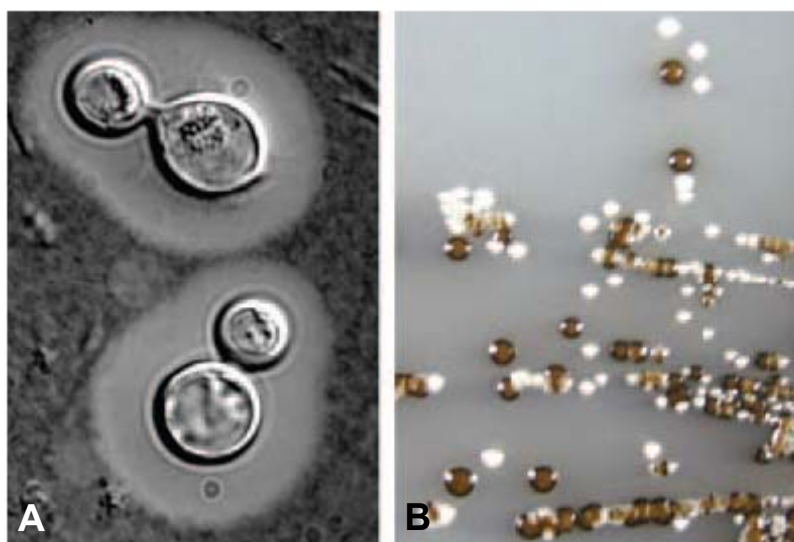


Figura 1. Características avaliadas na identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*. A: Visualização da cápsula polissacarídica por coloração negativa; B: Colônias pigmentadas pela produção de melanina no cultivo em Agar Niger (IDNURM *et al.*, 2005).

Para diferenciação bioquímica das espécies utiliza-se o cultivo em Agar CGB (canavanina, glicina e azul de bromotimol) (KWON-CHUNG *et al.*, 1982). O aminoácido L-canavanina é tóxico para *C. neoformans*, impedindo seu crescimento no meio; já *C. gattii* é resistente, e uma vez semeado utiliza glicina como fonte de carbono liberando amônia, alterando dessa forma o pH do meio que passa da cor amarelo esverdeado para azul cobalto. Em 2003, Khan e colaboradores descreveram uma linhagem de *C. neoformans* var. *grubii*, resistente a L-canavanina, mostrando a necessidade de testes adicionais na identificação de *C. gattii*.

A diferenciação molecular das espécies pode ser realizada por várias técnicas, incluindo: PCR com *primers* específicos para diferenciação das espécies (AOKI *et al.*, 1999; LEAL, 2006), PCR *fingerprinting* (MEYER *et al.*, 1999), padrão de RAPD (RUMA *et al.*, 1996; SORRELL *et al.*, 1996), padrão de RFLP (LATOUCHE *et al.*, 2003), AFLP *fingerprinting* (BOEKHOUT *et al.*, 2001),

entre outras. O PCR com *primers* específicos para diferenciação das espécies é uma técnica que utiliza quatro pares de *primers*: CNa 70S e CNa 70a; CNb 49S e CNb 49a, que originam produtos de amplificação de 695 pb e 448 pb, os quais são capazes de diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii*, respectivamente (AOKI *et al.*, 1999). O PCR *fingerprinting* é uma técnica amplamente utilizada para epidemiologia molecular de isolados de *C. neoformans* ou *C. gattii*. Utilizando uma seqüência de microssatélite (GACA)₄, é capaz de enquadrar isolados de ambas as espécies em 8 padrões utilizados mundialmente como referência, baseado no padrão de bandas: VNI (sorotipo A), VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD) e VNIV (sorotipo D), referentes a *C. neoformans*; VGI (sorotipo B), VGII (sorotipo B), VGIII (sorotipo B) e VGIV (sorotipo C), referentes a *C. gattii* (MEYER *et al.*, 1999).

1.2 Ecologia e Epidemiologia

C. neoformans é uma espécie cosmopolita e seu nicho característico são as excretas de pombos, sendo isolado com mais facilidade em excretas secas. Pesquisas mais recente têm demonstrado que seu nicho não é restrito, sendo isolado de excretas de diversas aves domésticas (ABEGG *et al.*, 2006), de poeira de casas e de árvores de diversas espécies (KOBAYASHI *et al.*, 2005; MEDEIROS RIBEIRO *et al.*, 2006). *C. neoformans* var. *neoformans* é isolado em menor escala se comparado a var. *grubii*, que tem distribuição mundial, sendo a mais associada aos casos existentes de criptococose. Os pacientes comumente infectados por *C. neoformans* são HIV - positivos, pacientes transplantados ou ainda pacientes com câncer, que estejam em quimioterapia, portanto esse fungo é considerado um patógeno oportunista (DROMER *et al.*, 1996; AKAMATSU *et al.*, 2004; TINTELNOT *et al.*, 2004; BARONI *et al.*, 2006).

C. gattii mostra-se mais relacionado a árvores de diversas espécies, mas há relatos de isolamento em excretas de aves e outros sítios ambientais (KIDD *et al.*, 2004; ABEGG *et al.*, 2006; MACDOUGALL & FYFE, 2006). Costumeiramente era descrito por habitar regiões tropicais e subtropicais, porém depois da descrição de uma epidemia nas ilhas Vancouver, no Canadá (KIDD *et al.*, 2004) e também por relatos de isolados na Itália (MONTAGNA *et*

al., 1997), na Espanha (COLOM *et al.*, 2005) e outros países, atualmente assume-se que ele exista também em climas temperados. Essa espécie acomete principalmente indivíduos imunocompetentes e por esse motivo é considerado um patógeno primário, porém há relatos, em menor escala, de imunocomprometidos infectados, na maioria dos casos pacientes HIV - positivos (MUYEMBE TAMFUM *et al.*, 1992; BODASING *et al.*, 2004).

Estudos realizados por Nishikawa *et al.*, (2003) e Lazera *et al.*, (2000) descrevem o isolamento de ambas as espécies habitando o mesmo nicho. Trabalhos, focando um nicho comum para ambas as espécies e sua dispersão já foram realizados, mostrando que a distribuição não está relacionada à espécie em particular ou ao padrão climático (GRANADOS & CASTAÑEDA, 2006; RANDHAWA *et al.*, 2006).

1.3 Criptococose

A criptococose é a terceira mais freqüente infecção neurológica causada em pacientes HIV-positivos e também a mais comum infecção fúngica do sistema nervoso central (LIN & HEITMAN, 2006). É caracterizada como uma doença sistêmica e na maioria dos casos oportunista, na qual devido ao diagnóstico tardio, resulta em uma disseminação do fungo e conseqüente óbito do paciente pela debilidade e posterior toxicidade dos antifúngicos empregados. Os agentes etiológicos são ambas as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, os quais se diferenciam na habilidade de causar a doença.

A forma de infecção não está totalmente descrita, mas acredita-se que ocorra após a inalação de propágulos infectivos do fungo, sendo estes os basidiósporos de sua fase sexual, ou leveduras dissecadas, dispersas no ambiente. Esses propágulos chegariam aos pulmões e produziriam ou não alguma doença, dependendo do estado imunológico do hospedeiro (LIN & HEITMAN, 2006). As infecções pulmonares por *Cryptococcus* são brandas e sem graves manifestações, por esse motivo geralmente não são tratadas, resultando em uma disseminação do fungo. Uma vez no pulmão, *C. neoformans* ou *C. gattii* por via hematogênica chegam ao sistema nervoso central, ocasionando meningoencefalites ou meningites.

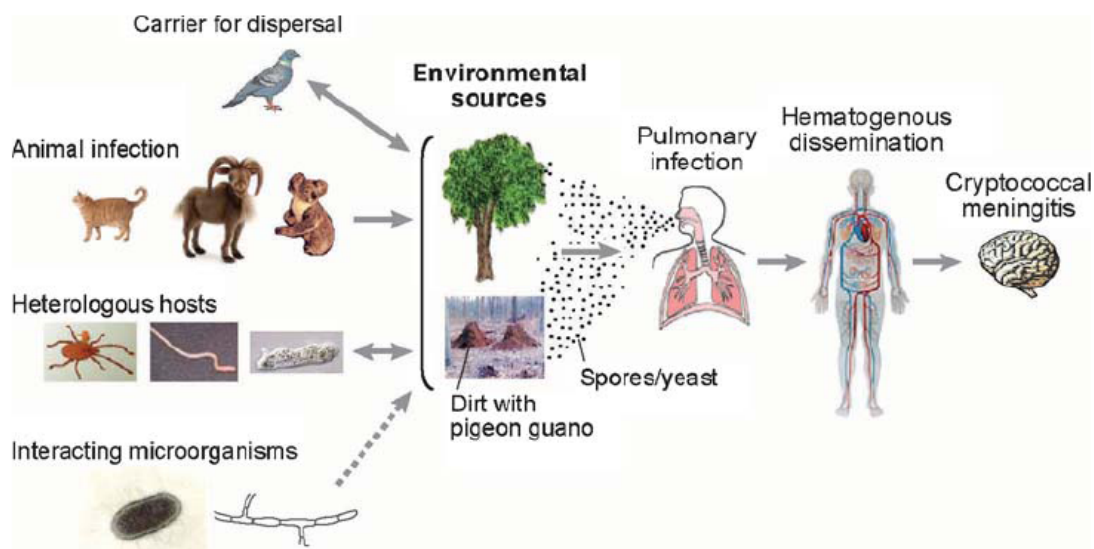


Figura 2. Ciclo infeccioso da criptococose. Propágulos infecciosos do fungo presentes em sítios ambientais podem se dispersar por carreadores naturais, ou infectar diversos animais, permanecer internalizados em hospedeiros heterólogos ou ainda interagir com outros microrganismos presentes no ambiente. Na infecção humana esses propágulos são inalados e alojam-se inicialmente nos pulmões, seguindo por uma disseminação hematogênica, ocasionam meningite criptocócica (LIN & HEITMAN, 2006).

Na forma disseminada, observa-se o desenvolvimento de infecções cutâneas na forma de pápulas, pústulas ou ainda nódulos subcutâneos (WEATHERHEAD *et al.*, 2006). Há casos raros de infecção cutânea primária, sem disseminação e ainda de infecções em outros órgãos (SICO & HUGHES, 2005; SEO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006).

O tratamento utilizado para criptococose baseia-se na administração do antifúngico anfotericina B em casos disseminados da doença, com tratamento de manutenção utilizando fluconazol. Em casos iniciais, de doença pulmonar ou local, sem disseminação, recomenda-se o uso de fluconazol ou outro azólico, como por exemplo, itraconazol. Antes do início do tratamento, devem ser avaliados o estado imunológico do paciente (imunocomprometido/ imunocompetente) e o quadro da doença (sistêmica ou localizada) (SAAG *et al.*, 2000).

1.4 Fatores de Patogenicidade

Os principais fatores de patogenicidade citados para *C. neoformans* e *C. gattii* incluem a cápsula polissacarídica, a produção de melanina e a habilidade de crescimento em temperatura corpórea humana. A cápsula é composta por dois polissacarídeos, glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), sendo a GXM envolvida diretamente as respostas do sistema imune do hospedeiro (MACFADDEN *et al.*, 2006). Apesar da descrição de isolados clínicos acapsulados (TORRES *et al.*, 2005; CHANTRANUWAT & SITTIPUNT, 2005; SIGIURA *et al.*, 2005; CHEON *et al.*, 2006), em geral nos isolados clínicos a cápsula normalmente apresenta-se bastante proeminente, atuando fortemente na defesa do fungo contra o sistema imune hospedeiro. Nos isolados ambientais, a cápsula está presente em alguns casos e pode proteger o fungo contra a desidratação (IDNURM *et al.*, 2005).

A melanina é um pigmento marrom, o qual protege o fungo da radiação ultravioleta e de predadores naturais quando no ambiente (HILL, 1992; STEENBERGEN *et al.*, 2001). Durante a infecção é formada pela oxidação de catecolaminas do hospedeiro, protegendo o fungo da ação de radicais livres tóxicos produzidos pelo sistema imune hospedeiro (POLACHECK *et al.*, 1982). O gene *LAC1* codifica para uma lacase (LAC1) envolvida na produção de melanina através da polimerização de substratos difenólicos (WILLIAMSON, 1994; SALAS *et al.*, 1996). Recentes estudos moleculares identificaram outra lacase, *LAC2*, envolvida na polimerização de compostos fenólicos para formação da melanina, porém é menos eficiente se comparada a *LAC1* (ZHU & WILLIAMSON, 2004). Outros genes já foram descritos por atuarem na maquinaria de produção da melanina, como por exemplo, *VPH1* e *CLC1* (ZHU & WILLIAMSON, 2003; IDNURM *et al.*, 2004), *VAD1* (PANEPINTO *et al.*, 2005), *CCC2*, *ATX1*, *VPH1*, *CLC1* e *SNF5* (WALTON *et al.*, 2005). Esses genes auxiliam a produção de melanina juntamente com a enzima lacase.

Outro fator de patogenicidade das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, é a capacidade de desenvolvimento a 37°C. Isso os capacita a se desenvolverem inicialmente no interior do hospedeiro possibilitando o estabelecimento da doença. Alguns estudos moleculares envolvendo o desenvolvimento a 37°C, identificaram genes que são diferencialmente expressos a essa temperatura se

comparado à temperatura do ambiente de 25°C (MISSALL *et al.*, 2004; KRAUS *et al.*, 2004; ROSA E SILVA, 2006).

1.5 Ciclo sexual

As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são isoladas de amostras clínicas e ambientais sob a forma leveduriforme. O ciclo sexual envolve uma transição dimórfica de uma levedura unicelular para o crescimento de uma hifa filamentosa por *mating* e pela frutificação monocariótica. O ciclo por *mating*, envolve células de ambos *mating type* “a” e “α”. Essas células haplóides opostas, por limitação de nutrientes, liberam feromônios e quando se encontram sofrem fusão e produzem filamentos dicarióticos. Na formação do basídio, os núcleos se fusionam e ocorre a meiose, formando quatro produtos meióticos. Os produtos meióticos passam por mitose e brotam na superfície do basídio, formando basidiósporos de diferentes *mating* para serem dispersos no ambiente (IDNURM *et al.*, 2005). O *mating type* é considerado um fator de virulência das espécies e variedades, uma vez que estudos realizados com *C. neoformans* var. *neoformans* mostram que a maioria dos isolados é *MAT* α e que as cepas *MAT* a são menos virulentas. *C. neoformans* var. *grubii* também apresenta uma contagem maior de cepas *MAT* α distribuídas no mundo, mas com padrão de virulência semelhante para ambos “a” e “α”, porém em infecção com ambos os *mating type*, o *MAT* α mostra-se mais virulento (NIELSEN *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2005). A espécie *C. gattii* possui ambos os *mating* distribuídos pelo mundo e quando isolados, apresentam infertilidade em laboratório. Entretanto, as cepas altamente virulentas isoladas da epidemia nas ilhas Vancouver – Canadá possuíam *MAT* α e passavam pelo ciclo de *mating* frequentemente (FRASER *et al.*, 2003).

A frutificação monocariótica é uma forma modificada da reprodução sexual que envolve células do mesmo *mating type*, mais comumente o tipo “α”, é o *mating type* predominante em ambos os isolados clínicos e ambientais. Porém, alguns isolados *MAT* a podem passar pela frutificação monocariótica (LIN *et al.*, 2006). As células tornam-se diplóides, por endoduplicação ou fusão nuclear e formam uma hifa monocariótica. No desenvolvimento do basídio, um

evento de meiose ocorre e os basidiósporos haplóides são formados para liberação no ambiente (IDNURM *et al.*, 2005). Essa forma de reprodução somente foi comprovada na espécie *C. neoformans* var. *neoformans* (LIN *et al.*, 2005).

1.6 Aspectos moleculares

Recentemente o sequenciamento do genoma de duas linhagens (JEC21 e B-3501A) de *C. neoformans* var. *neoformans* foi completado. Trata-se de um genoma de ~20 Mb, com 14 cromossomos, contendo ~6500 genes, ricos em íntrons. O transcriptoma desse eucarioto possui vários eventos de *splicing* alternativos e transcritos antisenso (LOFTUS *et al.*, 2005). Projetos de seqüenciamento em fase de finalização incluem a análise de uma linhagem de *C. neoformans* var. *grubii* (H99), de uma linhagem clínica (R265) e de uma linhagem ambiental (WM276) de *C. gattii* (IDNURM *et al.*, 2005). Com dados disponíveis do sequenciamento, aumenta a oportunidade de desenvolvimento de técnicas envolvendo expressão gênica global, comparação de genes e proteínas diferencialmente expressos sob determinadas condições, auxiliando na busca de alvos específicos para formulação de novas drogas e terapias no combate a essas espécies patogênicas (JIANG *et al.*, 2002; RUDE *et al.*, 2002; SCHEIN *et al.*, 2002; KRAUS *et al.*, 2004; MISSALL *et al.*, 2004; MISSAL *et al.*, 2006; ROSA E SILVA, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Baseado em um relato de caso clínico de criptococose, isolar *Cryptococcus neoformans* e/ou *Cryptococcus gattii* de uma Madeireira localizada na cidade de Cachoeira do Sul – RS.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar *C. neoformans* e/ou *C. gattii* de substratos existentes interna e externamente a Madeireira;
- Comparar e caracterizar os isolados de *C. neoformans* e/ou *C. gattii* por métodos bioquímicos tradicionais e por métodos moleculares;
- Testar o padrão de suscetibilidade a antifúngicos dos isolados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram realizadas 4 coletas, uma em cada estação do ano, em uma Madeireira na cidade de Cachoeira do Sul – RS. As coletas foram realizadas nos meses de maio (outono), julho (inverno), outubro (primavera) e dezembro (verão), respectivamente, no ano de 2005.

Foram coletadas amostras de serragem, pó de madeira e poeira do interior da Madeireira, de casca e folhas de troncos de eucalipto localizados na área externa da Madeireira e de excretas secas de pombos e galinhas encontradas próximas à Madeireira. Todas as amostras foram coletadas com o auxílio de espátulas estéreis e acondicionadas em placas de Petri estéreis para o transporte ao laboratório.

Em cada coleta foi realizado o monitoramento do ar, conforme descrito por Wojcik-Stopczynska *et al.* (2003) com modificações. O monitoramento foi realizado no interior da Madeireira utilizando - se 10 placas de Petri contendo Agar Níger (Tabela 1), adicionado de cloranfenicol (34µg/mL), por coleta. As placas eram dispostas em locais demarcados, a um metro de distância da parede, do chão e do teto, e permaneciam abertas por uma hora. Após a exposição eram fechadas, lacradas e transportadas ao laboratório, onde eram mantidas em estufa bacteriológica a 30°C e examinadas diariamente por até 10 dias para o aparecimento de colônias.

3.2 Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado segundo o protocolo descrito por Passoni *et al.* (1998) com modificações. Das amostras de serragem, pó de madeira, poeira, folhas e cascas de eucalipto foram pesados 0,3g de material e transferidas para 15mL de solução salina a 0,9% (Tabela 1). Das amostras de excretas de aves foram pesados 0,1g e também transferidas para cada 15mL de solução salina a 0,9%. Todas as amostras foram colocadas

em frascos Erlenmeyers e submetidas à agitação (150rpm) em shaker por 1 h. Após esse período foram mantidas sem agitação por 15 min para ocorrer a sedimentação e 100µL do sobrenadante foram coletados para semeadura em placas de Petri contendo Agar Níger acrescido de cloranfenicol (34mg/mL). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C e examinadas diariamente por 10 dias para o aparecimento de colônias.

3.3 Isolamento e Caracterização de *C. neoformans* e *C. gattii*

3.3.1 Isolamento de C. neoformans e C. gattii

As colônias marrons crescidas em Agar Níger foram repicadas isoladamente para placas de Petri contendo Agar Níger para a obtenção de colônias puras. Colônias isoladas eram repicadas para tubos de ensaio contendo Agar YEPG (Tabela 1) para posterior identificação. Para todos os isolados foram preparados dois tubos de Agar YEPG e mantidos a 4°C.

3.3.2 Caracterização Bioquímica

Foram realizados os testes bioquímicos padronizados para a identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*, tais como: pigmentação em Agar Níger (observada no isolamento), teste da presença da enzima urease em Agar Uréia de Christensen e a visualização microscópica da presença de cápsula por coloração negativa utilizando tinta nanquim. Para a diferenciação bioquímica das espécies foi realizado o teste com o meio CGB (canavanina – glicina e azul de bromotimol). Para cada teste foram utilizados controles positivos (isolados clínicos de *C. neoformans* e/ou *C. gattii* – linhagem HC6 e AL33, respectivamente) e negativos (meios sem inóculo).

3.3.2.1 Atividade de Urease

Para esse teste foi utilizado o Agar Uréia de Christensen (Tabela 1), onde a atividade da enzima urease pode ser observada pela mudança de coloração do indicador de pH vermelho de fenol de laranja para rosa, com a

mudança do pH de ácido para básico, sendo este o resultado positivo (NEUFELD, 1999; BARNETT *et al.*, 2000). As culturas foram inoculadas sobre o Agar Uréia de Christensen e incubadas a 30°C por seis dias, sendo examinadas diariamente.

3.3.2.2 Visualização da presença de cápsula

Para visualização microscópica da cápsula polissacarídica foram preparadas lâminas com uma gota de tinta nanquim e uma gota de água destilada. Uma alçada da colônia foi misturada ao nanquim e coberta com lamínula. A visualização foi realizada em microscópio óptico (Zeiss - Axiostar) em magnificação de 1000X (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

3.3.2.3 Agar CGB

O Agar CGB (Tabela 1) é utilizado para diferenciar fenotípicamente *C. neoformans* de *C. gattii*. O teste se baseia em parâmetros metabólicos observados para *C. gattii*, que são: a assimilação de glicina como única fonte de carbono e a resistência ao aminoácido L-canavanina. O teste positivo é observado quando a cor amarela esverdeada do meio torna-se azul-cobalto como resultado da alcalinização através da amônia liberada durante a degradação da glicina (KWON-CHUNG *et al.*, 1982). Os isolados foram inoculados em meio Agar CGB em tubos e incubados a 30°C por sete dias.

3.3.3 Caracterização Molecular

3.3.3.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído conforme protocolo descrito por Zhang *et al.* (1996), com modificações. Colônias dos isolados foram semeadas em placas contendo Agar YEPG e incubadas a 30°C por 2 dias. Retirou-se 3 a 4 alçadas da cultura, que foram maceradas até pó em gral com pistilo e adição de nitrogênio líquido, ressuspendidas em 500µL de tampão de lise (Tris-HCl pH 7,5 0,2M / NaCl 0,5M / EDTA 0,01M / SDS 1%) e 500µL de fenol-clorofórmio (1:1) e agitadas em vortex por 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente extraído com 300µL de fenol-clorofórmio (1:1), agitado em vortex por 5 min e centrifugado. O sobrenadante final foi coletado e os ácidos nucléicos foram

precipitados com 2V de etanol absoluto por 1 h, centrifugados, lavados com etanol 70% e secos a temperatura ambiente. Os ácidos nucléicos foram ressuspensos em 80µL de TE (Tris pH 8,2 10 mM / EDTA pH 8 1mM) e tratados com 2µL de RNase A (20µg/mL) por incubação em banho-maria por 30 minutos a 37°C. O DNA foi migrado em gel de agarose 0,8% a 100 volts por 1 h, visualizado em luz UV para a quantificação e estocado a -20°C para posteriores testes.

3.3.3.2 PCR para diferenciação das espécies

A diferenciação molecular das espécies foi realizada utilizando os pares de *primers*: CNa 70S (5'-ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC-3'); CNa 70A (5'-ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3') e CNb 49S (5'-ATTGCGTCCAAGGTGTTGTTG-3'); CNb 49A (5'-ATTGCGTGGAACCGTTATC-3'), descritos por Aoki *et al.* (1999). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 2µL de DNA genômico (50ng/µL); 2,5µL de tampão 10X (10 mM Tris HCl pH 8,3/ 50 mM KCl/ 1,5 mM MgCl₂); 1,15µL de MgCl₂ (50mM); 2,5µL de dNTP (1mM); 0,5µL de cada *primer* (CNa 70A/ CNa 70S/ CNb 49A/ CNb 49S) e 0,5µL de Taq-polimerase (5U/µL - CenBiot Enzimas). Todas as reações foram realizadas em um termociclador (MiniCycler™, MJ Research), por um aquecimento inicial a 94°C/10 min e 35 ciclos compreendendo 94°C/1 min de desnaturação, 65°C/1 min de anelamento, 72°C/2 min de extensão. Após os ciclos, foi realizada uma extensão final a 72°C/10 min (LEAL, 2006). Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, após migração por 1 h a 100 volts. Foram utilizados controles negativos (reações completas sem adição de DNA genômico) e controles positivos (reações completas com DNA de *C. neoformans* e *C. gattii* – linhagens HC6 e AL33, respectivamente). As reações de amplificação foram realizadas em duplicata para confirmação do resultado.

3.3.3.3 PCR *fingerprinting*

Esta técnica foi utilizada conforme descrito por Meyer *et al.* (1999). O *primer* utilizado foi a seqüência de microssatélite (GACA)₄. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 1µL de

DNA genômico (50ng/μL); 2,5μL de dNTP (1mM); 1,5μL de *primer* (GACA)₄ (20pmol/μL); 2,5μL de tampão Taq-polimerase 10X (10 mM Tris HCl pH 8,3/ 50 mM KCl); 1,25μL de MgCl₂ (50mM); 0,15μL de Mg(C₂H₃O₂)₂; 0,5μL de Taq-polimerase (5U/μL - CenBiot Enzimas). As reações de PCR foram realizadas em termociclador (MiniCycler™, MJ Research) com 40 ciclos de: 94°C/20 seg para desnaturação, 50°C/1 min para o anelamento, 72°C/20 seg para extensão e após os 40 ciclos, uma extensão final de 72°C/6 min. Os produtos de amplificação foram visualizados após eletroforese por 6h a 60 volts em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídio. Os padrões utilizados foram fornecidos por Wieland Meyer (Center for Infections Disease and Microbiology, Molecular Micology Laboratory, The University of Sydney, Department of Medicine at Westmead Hospital, Westmead, Austrália): WM148 (VNI – sorotipo A), WM626 (VNII – sorotipo A), WM628 (VNIII – sorotipo AD), WM629 (VNIV – sorotipo D), WM179 (VGI – sorotipo B), WM178 (VGII – sorotipo B), WM161 (VGIII – sorotipo B), WM779 (VGIV – sorotipo C). As reações de amplificação foram realizadas em duplicata para confirmação do resultado.

3.3.3.4 PCR para determinação dos *mating type* “a” e “α”

Os ensaios para determinação dos *mating type* dos isolados foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – SP. Foram utilizados os seguintes pares de *primers* para *MAT* α: 5'-CTTCACTGCCATCTTCACCA-3' e 5'-GACACAAAGGGTCATGCCA-3'; e para *MAT* a: 5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT-3' e 5'-AACGCAAGAGTAAGTCGGGC-3' (CHATURVEDI *et al*, 2000). As reações foram realizadas em um volume final de 25μL contendo: 1μL de DNA genômico (25ng/μL); 1μL de cada *primer* (25pmol/μL), misturados com deoxiribonucleotídeos (0,22mM de cada dNTP), tampão (1,65mM MgCl₂, 55mM KCl, 22mM Tris-HCl – pH 8,4) e Taq-polimerase fornecidos pelo Kit PCR Supermix (Invitrogen-life technologies). A amplificação foi realizada através de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C/ 3 min, seguidos por 30 ciclos de 94°C/ 1 min, 57,5°C/ 1 min, 72°C/ 1 min e um ciclo final de 72°C/ 7 min. As reações foram realizadas utilizando um termociclador Perkin Elmer modelo *GeneAmp PCR System 9700*. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2%, por 2h a 100 volts,

corado com brometo de etídio e visualizado a luz UV. Como controles positivos foram utilizadas as linhagens ATCC 28957 (sorotipo D, MAT α) e ATCC 28958 (sorotipo D, MAT α) e como controles negativos, reações completas sem adição de DNA genômico. As reações de amplificação foram realizadas em duplicata para confirmação do resultado.

3.3.4 Suscetibilidade a antifúngicos

3.3.4.1 Antifúngicos e técnica utilizada

Os perfis de sensibilidade dos isolados foram estudados frente à anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol, segundo o documento M27-A2 (2002) do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) com modificações. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – SP. Foi utilizado o meio RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol), tamponado com MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) pH 7,0 acrescido de 2% de glicose (Tabela 1) e incubação a 35°C, sob agitação constante, durante 72 h, utilizando placas estéreis de fundo plano com 96 poços. A leitura dos resultados foi realizada por espectrofotometria em 490nm. A interpretação foi baseada em 50% de inibição para os azóis e 5-fluorocitosina e 90% de inibição para anfotericina B. Foi utilizada como controle dos testes uma cepa padrão ATCC 90012 de *C. neoformans*.

3.3.4.2 Diluições das drogas e inóculos

As drogas antifúngicas foram obtidas diretamente dos fabricantes na forma de pó e calculadas, quanto às suas potências seguindo recomendações do documento. Anfotericina B e itraconazol foram dissolvidas, cada uma, em dimetilsulfóxido para obtenção de uma solução estoque a 3200 μ g/mL. As soluções-estoque de fluconazol e 5-fluorocitosina foram preparadas, cada uma, em água destilada estéril e ajustadas para 10240 μ g/mL. A partir destas concentrações foram preparadas 10 soluções intermediárias seguindo o esquema de diluição do anexo 1. As concentrações intermediárias variaram de 3200 a 6,25 μ g/mL (diluição 1/2) para anfotericina B e itraconazol e de 1280 a 2,5 μ g/mL (diluição 1/2) para fluconazol e 5-fluorocitosina.

O meio líquido utilizado para a diluição das drogas e para ajuste de inoculo foi o RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) na concentração de 10,4g/L acrescido de 2% de glicose e tampão MOPS 0,165M, pH 7,0, esterilizado através de filtração e conservado em refrigerador a 4°C.

As soluções intermediárias das drogas foram diluídas 1:100 para anfotericina B e itraconazol e 1:10 para fluconazol e 5-fluorocitosina para se obter uma solução de trabalho de 32 a 0,0625µg/mL para anfotericina B e itraconazol e de 128 a 0,25µg/mL para as drogas 5-fluorocitosina e fluconazol que foram dispensadas (volume de 100µL) nos poços da coluna 2 a 11. A fileira 2 contendo a maior e a 11 a menor concentração da droga, respectivamente. As placas foram estocadas a -70°C ou quando utilizadas no dia seguinte, permaneceram entre 4 a 6°C.

Foram utilizadas culturas recentes de 48 h de crescimento em meio Agar YEPG a 30°C. Colônias isoladas foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,85% e homogeneizadas em vortex por 15 seg. A concentração dos inóculos foi ajustada até se obter uma transmitância equivalente ao tudo da escala de 0,5 de McFarland, correspondente a uma concentração na ordem de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, os inóculos foram diluídos (1/100) em meio RPMI 1640, para obtenção de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL. Esta última foi dispensada nos poços de 2 a 11 (volume de 100µL) começando da fileira 2 que continha 100µL da maior concentração de droga até a fileira 11 com a menor concentração. Este passo diluiu o inoculo ($0,5 \times 10^4$ UFC/mL) e a concentração das drogas à metade (16 a 0,0313µg/mL para anfotericina B e itraconazol e de 64 a 0,125µg/mL para as drogas 5-fluorocitosina e fluconazol). O controle de crescimento consistiu de 100µL de meio livre da droga (C+), e 100µL da suspensão da levedura (poço 12). O poço da fileira 1 não continha suspensão de leveduras, apenas meio livre de droga (200µL), funcionando como controle de esterilidade ou branco para leitura espectrofotométrica (C-).

As placas foram incubadas a 35°C, sob agitação constante, e a leitura foi realizada após 72 h, através de leitor automatizado para placas de microdiluição a 490nm.

A determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) para anfotericina B foi feita pela inibição de 90% do crescimento, quando comparada

ao controle positivo e para 5-fluorocitosina e os azóis, leituras com 50% de inibição.

3.3.4.3 Critérios para Leitura

De acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), para fluconazol: cepas com $CIM_{50} \leq 8,0\mu\text{g/mL}$ foram consideradas sensíveis, entre $16-32\mu\text{g/mL}$ sensíveis dependente da dose e $\geq 64\mu\text{g/mL}$ resistentes. Para itraconazol $CIM_{50} \geq 1,0\mu\text{g/mL}$ foram consideradas resistentes, $\leq 0,125\mu\text{g/mL}$ sensíveis e entre $0,25-0,5\mu\text{g/mL}$ sensíveis dependente de dose; já para 5-fluorocitosina, cepas com $CIM_{50} \geq 32\mu\text{g/mL}$ resistentes, entre $8-16\mu\text{g/mL}$ intermediário e $\leq 4,0\mu\text{g/mL}$ sensíveis. Por fim, a norma M27-A2, não define claramente os limites para identificação de isolados sensíveis e resistentes à anfotericina B. Dados da literatura assumem um perfil de resistência para $CIM > 1\mu\text{g/mL}$ (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1998).

3.4 Meios de Cultivo e Soluções

Os meios utilizados para o desenvolvimento dos testes estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Meios de cultivo e soluções empregados para realização dos testes.

Agar CGB	10% glicina; 1% fosfato de potássio monobásico; 1% sulfato de magnésio; 0,01% cloridrato de tiamina; 0,3% sulfato de L-canavanina, 0,4% azul de bromotimol sódico, 2% Agar.
Agar Níger	20% semente de Niger, 2% Agar.
Agar Uréia de Christensen	1% peptona, 1% Glicose, 5% NaCl, 2% Fosfato monopotássico, 0,012% Vermelho de Fenol, 3% Uréia.
Agar YEPG	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 2% Agar.
Meio para testes de suscetibilidade a antifúngicos	RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol), 2% glicose, tampão MOPS 0,165M, pH 7,0.
Solução Salina	NaCl 0,9% ou 0,85%.

4 RESULTADOS

Das quatro coletas realizadas, totalizando 40 sítios amostrais do ar interno da Madeireira, 40 amostras de excretas de pombos e galinhas e 63 amostras no interior da Madeireira (entre serragem, pó de madeira, poeira, folha e casca de eucalipto), foram obtidos três isolados de *C. neoformans* var. *grubii*, sorotipo A e um isolado de *C. gattii*, sorotipo B. *C. neoformans* foi isolado de uma amostra de pó de madeira, no mês de maio (cepa JC1) e de excreta seca de galinha e de pombo no mês de dezembro (cepas JC2 e JC3). *C. gattii* foi isolado de excreta seca de pombo, no mês de dezembro (cepa JC4).

4.1 Caracterização Morfológica e Bioquímica

Os quatro isolados apresentaram produção de melanina em meio Agar Niger e atividade de urease em meio Agar Uréia de Christensen. Todos se mostraram encapsulados em tinta nanquim, porém foram observadas diferenças entre o tamanho capsular dos isolados JC1, JC2 e JC3 em comparação com o isolado JC4.

No teste com o meio Agar CGB o isolado JC4 foi caracterizado como *C. gattii* e os demais como *C. neoformans*. Os resultados dos testes morfológicos e bioquímicos realizados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos pela caracterização bioquímica e morfológica dos isolados no estudo.

Isolados	Origem	Produção de melanina	Atividade de Urease	Cápsula*	Agar CGB
JC1	Pó de madeira	+	+	pequena	-
JC2	Excreta de galinha	+	+	pequena	-
JC3	Excreta de pombo	+	+	pequena	-
JC4	Excreta de pombo	+	+	grande	+

*O tamanho da cápsula varia entre 4 a 30µm (CASADEVALL & PERFECT, 1998)

4.2 Caracterização Molecular

No teste para a diferenciação das espécies, os isolados JC1, JC2 e JC3 apresentaram produtos de amplificação de 695pb, correspondentes ao controle positivo da espécie *C. neoformans* (linhagem HC6). O isolado JC4 não apresentou amplificação. Os resultados estão apresentados na figura 3.

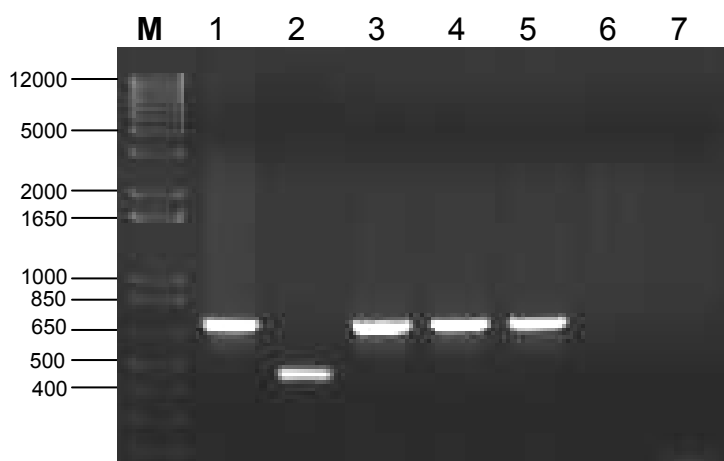


Figura 3. Diferenciação molecular das espécies *C.neoformans*/ *C.gattii*. M: marcador de tamanho molecular (1Kb DNA Ladder - Invitrogen); Canaletas 1 e 2: Amplificação dos controles positivos para *C. neoformans* (linhagem HC6) e *C. gattii* (linhagem AL33), respectivamente; Canaletas 3, 4 e 5: isolados JC1, JC2 e JC3; Canaleta 6: isolado JC4; Canaleta 7: controle negativo da reação, sem DNA.

Os tipos moleculares com os sorotipos correspondentes dos isolados foram identificados por PCR *fingerprinting*. O padrão de bandas obtido pelos isolados foi comparado aos oito padrões existentes, os quais caracterizam os sorotipos A, B, C, D e AD (MEYER *et al.*, 1999). Os isolados JC1, JC2 e JC3 apresentaram-se idênticos ao padrão VNI, correspondente ao sorotipo A, espécie *C.neoformans* var. *grubii*. Já para JC4, o padrão de bandas apresentado foi semelhante ao padrão VGI relacionado à *C. gattii*, sorotipo B (Figura 4).

Foram determinados os *mating type* dos isolados por PCR. Todos se apresentaram como *MAT* "α" (dados não apresentados).

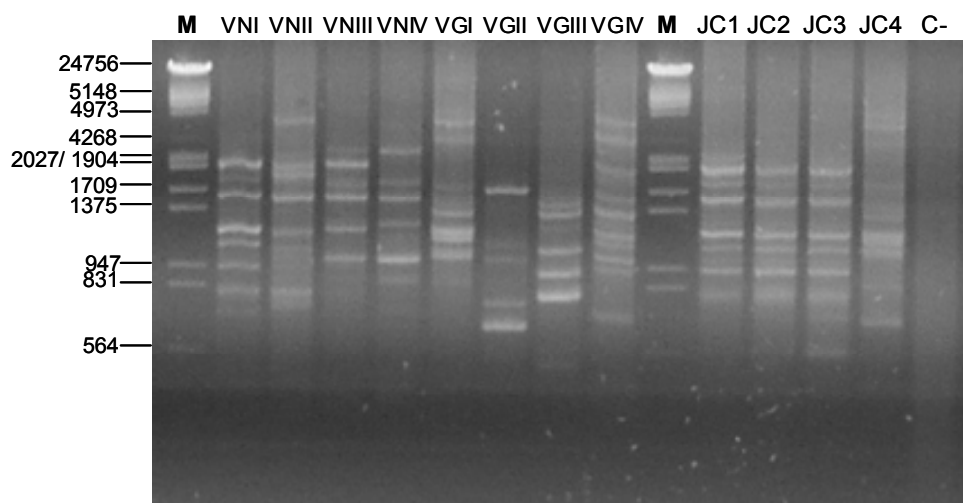


Figura 4: PCR *fingerprinting* para identificação dos tipos moleculares das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. M: marcador de tamanho molecular (λ EcoRI/HindIII); VNI (WM148 – sorotipo A), VNII (WM626 – sorotipo A), VNIII (WM628 – sorotipo AD) e VNIV (WM629 – sorotipo D): padrões da espécie *C. neoformans*; VGI (WM170 – sorotipo B), VGII (WM178 – sorotipo B), VGIII (WM161 – sorotipo B) e VGIV (WM779 – sorotipo C): padrões da espécie *C. gattii*; JC1, JC2 e JC3: isolados positivos para *C. neoformans* padrão VNI; JC4: isolado positivo para *C. gattii* padrão VGI; C-: controle negativo da reação, sem DNA.

4.3 Suscetibilidade a Antifúngicos

Os resultados dos testes de suscetibilidade a antifúngicos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Padrão de suscetibilidade a antifúngicos apresentado pelos isolados do estudo.

Antifúngicos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	Testados	JC1	JC2	JC3	JC4
<i>Anfotericina B</i>		0,125(S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,25 (S)
<i>Fluconazol</i>		4 (S)	4 (S)	8 (S)	16 (SDD)
<i>5-fluorocitosina</i>		8 (I)	8 (I)	4 (S)	2 (S)
<i>Itraconazol</i>		0,0625 (S)	0,0625 (S)	0,0625 (S)	0,25 (SDD)

S= sensível; SDD= sensível dependente de dose; I= intermediário; R= resistente.

Em relação aos valores de referência estabelecidos para cada antifúngico testado, os isolados JC1 e JC2 apresentaram sensibilidade intermediária para 5-fluorocitosina e sensibilidades para os demais antifúngicos. O isolado JC3 se mostrou sensível a todos antifúngicos. Já o

isolado JC4 se demonstrou sensível dependente da dose para os antifúngicos fluconazol e itraconazol e sensível para anfotericina B e 5-fluorocitosina.

5 DISCUSSÃO

Esse estudo teve por base, um caso clínico de criptococose em um indivíduo aparentemente imunocompetente (descrito no Capítulo I). Esse indivíduo residia e trabalhava em uma Madeireira na cidade de Cachoeira do Sul - RS, local das coletas. Trata-se de um ambiente rico em pó de madeira no seu interior e com aves (pombos e galinhas) e troncos de eucalipto na parte externa. Vários trabalhadores freqüentam o local diariamente. O objetivo inicial era confirmar o possível foco da infecção, através de comparações moleculares entre o isolado clínico e os isolados ambientais. Isso não foi possível pela ausência do isolado clínico, o qual foi descartado após o diagnóstico de criptococose. Partindo desse ponto, um isolamento de *C. neoformans* e/ou *C. gattii* foi iniciado nessa Madeireira, visando um provável sítio de infecção para outros indivíduos. A ecologia de ambas as espécies está bem caracterizada, mostrando nichos característicos, porém não específicos. *C. neoformans* possui uma tendência a habitar excreta, principalmente de pombos, porém vários estudos mostram o isolamento desse fungo de excreta de outras aves (TAY *et al.*, 2005; ABEGG *et al.*, 2006), de árvores (ERGIN *et al.*, 2004; GUGNANI *et al.*, 2005; MEDEIROS RIBEIRO *et al.*, 2006) e de poeira de ambientes domésticos (SWINNE *et al.*, 1989; PASSONI *et al.*, 1998). Os isolados do complexo *C. neoformans* da Madeireira de Cachoeira do Sul corroboram com esses achados, sendo dois isolados de excretas (pombo e galinha) e um isolado de pó de madeira coletado no interior da Madeireira. Em relação à espécie *C. gattii*, esta é isolada frequentemente de árvores, porém já foi descrito seu isolamento em outros nichos (ABEGG *et al.*, 2006; KIDD *et al.*, 2006). Nesse estudo, foi obtido um isolado dessa espécie proveniente de excreta de pombo. Esses achados indicam a existência desses patógenos no local de estudo, o que era esperado, pois são nichos naturais já descritos para os mesmos.

A identificação dos quatro isolados foi realizada pelos métodos tradicionais e todos foram submetidos a métodos moleculares para uma completa caracterização. As espécies foram diferenciadas utilizando o meio CGB (canavanina - glicina e azul de bromotimol) e a confirmação desse

resultado foi realizada pela PCR para diferenciação das espécies (AOKI *et al.*, 1999; LEAL, 2006). Os isolados JC1, JC2 e JC3, que apresentaram resultado negativo em CGB e geraram um produto de amplificação de 695pb na PCR, correspondente a espécie *C. neoformans*, confirmando a espécie. Para o isolado JC4, o qual foi positivo em meio CGB, não houve amplificação correspondente à espécie esperada, *C. gattii*, talvez por alguma alteração molecular da linhagem isolada. Outra técnica molecular utilizada foi a PCR *fingerprinting*, a qual possibilita a determinação tipos moleculares com seus respectivos sorotipos e conseqüentemente, a confirmação das variedades e espécies (MEYER *et al.*, 1999). Os padrões apresentados pelos isolados utilizando essa técnica foram satisfatórios e possibilitaram a conclusão da identificação. O *mating type* de cada isolado foi determinado por PCR. Os três isolados de *C. neoformans* são pertencentes à variedade *grubii*, sorotipo A, MAT α . O isolado de *C. gattii* pertence ao sorotipo B, MAT α .

Segundo dados de epidemiologia molecular de isolados do Brasil, os isolados da madeira concordam quanto ao padrão epidemiológico assumido nesse país para sorotipos e *mating type* (CASALI *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003; MATSUMOTO, 2006). Alguns estudos apresentam a existência de outros sorotipos e de MAT α , porém em menor escala (TRILLES *et al.*, 2003; BARRETO DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; MEDEIROS RIBEIRO *et al.*, 2006). Dados epidemiológicos globais desses patógenos, tanto clínicos como ambientais, indicam uma prevalência de *C. neoformans* var. *grubii*, MAT α . Um estudo realizado por Tortorano e colaboradores (1997) na Itália, mostrou um quadro diferenciado, com prevalência de isolados do sorotipo D em 71% se comparado ao sorotipo A, 24,6% e o híbrido AD com 3,4%. Porém, estudos mais recentes realizados na Europa apresentam números semelhantes aos encontrados em outros países, como Colômbia, Índia, Argentina, Chile, México, Peru, Venezuela e Brasil, com predomínio de *C. neoformans* var. *grubii*, MAT α (MEYER *et al.*, 2003; TINTELOT *et al.*, 2004; JAIN *et al.*, 2005; ESCADÓN *et al.*, 2006; VIVIANI *et al.*, 2006). Escadón *et al.* (2006) em seus estudos na Colômbia, encontraram uma prevalência de MAT α nos isolados de *C. gattii* sorotipo B um dado ainda não observado em outros locais.

Ambas as espécies fúngicas são agentes etiológicos da mesma doença, a criptococose. Essa doença apresenta diferentes formas clínicas durante sua

evolução, porém a fase mais grave é a meningite ou a meningoencefalite, pois o fungo já está disseminado no organismo (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Para a escolha do tratamento utilizado deve se levar em conta o estado imunológico do paciente e o sítio da doença. Para casos de indivíduos imunocompetentes, com doença pulmonar ou cutânea, com garantia de nenhuma disseminação do fungo pelo sangue e sistema nervoso central (SNC) o tratamento indicado é fluconazol com doses entre 200 - 400mg/dia de 3 a 6 meses. Nos casos disseminados em indivíduos imunocompetentes, ou imunocomprometidos HIV-negativos, emprega-se o uso de anfotericina B (0,7 – 1mg/kg/dia) combinado ou não com 5-fluorocitosina (100mg/kg/dia) por 6 – 10 semanas. Em indivíduos HIV-positivos com doença não disseminada é sugerido o tratamento com fluconazol (200 – 400 mg/dia), mantendo esse tratamento por toda vida; já em casos disseminados, emprega-se o uso de anfotericina B (0,7 – 1mg/kg/dia), fluorocitosina (100mg/kg/dia por 2 semanas), seguido por fluconazol (400mg/dia por 10 meses – 200mg/dia por toda vida) (SAAG *et al.*, 2000). Entretanto, graves índices de letalidade (~9,4%), associado às altas taxas de persistência e freqüentes recidivas da doença têm aumentado a preocupação de clínicos em relação ao surgimento de linhagens com resistência a antifúngicos (BRANDT *et al.*, 1996; VAN DER HOST *et al.*, 1997; BERG *et al.*, 1998). Por esse motivo, uma análise do perfil de sensibilidade a antifúngicos comumente usados no tratamento da criptococose, foi traçada nos isolados da madeireira. Para os isolados da espécie *C. neoformans*, JC1 e JC2 mostraram perfis idênticos, com suscetibilidade intermediária para o antifúngico 5-fluorocitosina e sensibilidade para os demais; JC3 apresentou sensibilidade a todos os antifúngicos testados. O isolado JC4, correspondente a espécie *C. gattii*, apresentou-se sensível dependente da dose para os antifúngicos fluconazol e itraconazol e sensível para os demais. A literatura apresenta que isolados clínicos e ambientais possuem padrões idênticos de sensibilidade a antifúngicos (DELGADO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2005). Estudos realizados com isolados brasileiros, mostram perfis de sensibilidade semelhantes aos obtidos por nossos isolados, não havendo registros de resistência entre os isolados analisados (TRILLES *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2005; MATSUMOTO, 2006). Moraes e colaboradores (2003) em seus estudos comparativos entre dois diferentes protocolos para testes de suscetibilidade verificaram resistência

a anfotericina B de 40% das cepas de *C. gattii* avaliadas, o que não foi confirmado quando as cepas foram submetidas ao teste com o protocolo M27-A2 do CLSI, utilizado nesse estudo. Apesar de não haver diferenças significantes, *C. gattii* apresentou-se menos sensível se comparado a *C. neoformans*.

A criptococose cresceu em proporções alarmantes com o surgimento da Aids, o avanço nos transplantes de órgãos, os tratamentos com corticosteróide e outras drogas capazes de deprimir o status imune. Na década de 90 assumia-se que somente indivíduos imunocomprometidos adquiriam essa doença, com alguns casos raros de infecção em imunocomprometidos (MITCHELL & PERFECT, 1995). Atualmente o número de casos em indivíduos ditos “aparentemente imunocompetentes” vem crescendo constantemente. Isso é atribuído ao uso de terapias anti-retrovirais, que diminuem o risco de infecção em HIV-positivos e também ao surgimento de imunossupressores, que deprimem o estado imunológico de indivíduos imunocompetentes (DROMER *et al.*, 2004; CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006). Como descrito anteriormente, a infecção por *Cryptococcus* se dá por inalação de propágulos infectivos do fungo dispersos no ambiente. Nesse estudo na Madeireira, um dos isolados é proveniente de pó de madeira, que é frequentemente inalado pelos trabalhadores ali presentes. Sabendo da existência desses potenciais patógenos nessa Madeireira e assumindo o quadro atual de disseminação dessa micose sistêmica, medidas profiláticas devem ser tomadas nesse local para evitar novas contaminações. Uma sugestão seria adotar o uso de máscaras nasais pelos trabalhadores: é um método higiênico, de baixo custo e eficaz na prevenção da criptococose e de outras doenças sistêmicas com semelhante modo de infecção.

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos no estudo, pode-se concluir que:

- Foram obtidos três isolados de *C. neoformans* provenientes de pó de madeira, excreta de pombo e excreta de galinha. Um isolado da espécie *C. gattii* foi obtido, proveniente de excreta de pombo.
- Os métodos bioquímicos e moleculares utilizados possibilitaram a identificação e caracterização dos isolados. Os três isolados de *C. neoformans* pertencem ao tipo molecular VNI, sorotipo A, var. *grubii* e são *MAT α* . O isolado da espécie *C. gattii* é de tipo molecular VGI, sorotipo B, *MAT α* .
- Foram realizados testes de sensibilidade nos isolados do estudo utilizando os antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina. Todos apresentaram sensibilidade, ou sensibilidade intermediária ou dependente da dose em relação aos antifúngicos testados. Não houve registro de resistência a essas drogas no presente estudo.
- Estudos no ambiente de pacientes com criptococose são válidos para se avaliar um possível foco de infecção e assim evitar novos casos ou recidivas da doença.

REFERÊNCIAS

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v. 161, p. 83 – 91, 2006.

AKAMATSU, N.; SUGAWARA, Y.; NAKAJIMA, J.; KISHI, Y.; KANEKO, J.; MAKUUCHI, M. Cryptococcosis after living donor liver transplantation: report of three cases. **Transpl Infect Dis**, v. 7, p. 26 – 29, 2004.

AOKI, F.H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N.F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A.Z.; BRANCHINI, M.L. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepare don the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprinting pattern analysis. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 315 – 320, 1999.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts, Characteristics and Identification**. 3rd edition, Cambridge University Press, Cambridge, 2000, 811p.

BARONI, F.A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.; OLIVEIRA, M.T.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, p. 71 – 75, 2006.

BARRETO DE OLIVEIRA, M.T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F.A.; LAZERA, M.S.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I.N.; PAULA, C.R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 1356 – 1359, 2004.

BERG, J.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. **Clin Infect Dis**, v. 26, p. 186 – 187, 1998.

BODASING, N.; SEATON, R.A.; SHANKLAND, G.S.; KENNEDY, D. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an HIV-positive patient: first observation in the United Kingdom. **J Infect**, v. 49, p. 253 – 255, 2004.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J.W.; HOP, W.C.; ABELN, E.C.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.147, p. 891 – 907, 2001.

BRANDT, M.E.; HUTWAGENER, L.C.; KLUG, L.A.; BAUGHMAN, W.S.; RIMLAND, R.; GRAVISS, E.D.; HAMILL, R.J. THOMAS, C.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; PINNER, R. W. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 912 – 917, 1996.

CASADEVALL, A. & PERFECT J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, 1998, 541 p.

CASALI, A.K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA, L.K.; RIBEIRO, A.M.; AMARAL, A.A.; ALVES, S.H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res**, v. 3, p. 405 – 415, 2003.

CHANTRANUWAT, C. & SITTIPUNT, C. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia caused by capsule-deficient cryptococcosis. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 36 p. 174 – 177, 2005.

CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J.; MCCLELLAND, C.M.; WICKES, B.L.; CHATURVEDI, V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α pheromone to determine mating type, ploidy and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 2007 – 2009, 2000.

CHAYAKULKEEREE, M. & PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 20, p. 507 – 544, 2006.

CHEON, W.S.; EOM, K.S.; YOO, B.K.; JANG, S.H.; BAHN, J.W.; KIM, D.G.; JUNG, K.S. A case of pulmonary cryptococcosis by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. **Korean J Intern Med**, v. 21, p. 83 – 87, 2006.

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. **NCCLS document M27-A2**, 2002.

COLOM, M.F.; FRASES, S.; FERRER, C.; JOVER, A.; ANDREU, M.; REUS, S.; SANCHEZ, M.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M. First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3548–3550, 2005.

DELGADO, A.C.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M.C.; MORETTI, M.L. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, v. 159, p. 7 – 11, 2005.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; LAPORTE, A. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 23, p. 82 – 90, 1996.

DROMER, F.; MATHOULIN-PELISSIER, S.; FONTANET, A.; RONIN, O.; DUPONT, B.; LORTHOLARY, O.; FCSG. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985–2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. **AIDS**, v. 18, p. 555 – 562, 2004.

ERGIN, C.; IIKIT, M.; HILMIOGLU, S.; KALELI, I.; GULBABA, A.G.; DEMIRCI, M.; KAYA, S. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from Eucalyptus trees in South Aegean and Mediterranean Regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. **Mycopathologia**, v. 158, p. 43 – 47, 2004.

ESCANDÓN, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, M.; MEYER, W.; CASTANEDA, 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. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 625 – 635, 2006.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; HAZEN, K.C.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; SCALISE, G. Standardization of Antifungal Susceptibility Testing and Clinical Relevance. **Med Mycol**, v. 36, p. 68 – 78, 1998.

FRASER, J. A.; SUBARAN, R. L.; NICHOLS, C. B.; HEITMAN, J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryot Cell**, v. 2, p. 1036 – 1045, 2003.

GRANADOS, D.P. & CASTAÑEDA, E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 636 – 644, 2006.

GUGNANI, H.C.; MITCHELL, T.G.; LITVINTSEVA, A.P.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J.; KUMAR, A.; BASU, S.; PALIWAL-JOSHI, A. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of Eucalyptus trees in India. **Med Mycol**, v. 43, p. 565 – 569, 2005.

HILL, H.Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant. **Bioassays**, v. 14, p. 49 – 56, 1992.

IDNURM, A.; REEDY, J.L.; NUSSBAUM, J.C.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryot Cell**, v. 3, p. 420 – 429, 2004.

IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 753 – 764, 2005.

JAIN, N.; WICKES, B.L.; KELLER, S.M.; FU, J.; CASADEVALL, A.; JAIN, P.; RAGAN, M.A.; BANERJEE, U.; FRIES, B.C. Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 5733 – 5742, 2005.

JIANG, B.; BUSSEY, H.; ROEMER, T. Novel strategies in antifungal lead discovery. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, p. 466 – 471, 2002.

KHAN, Z.U.; AL-ANEZI, A.A.; CHANDY, R.; XU, J. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **J Med Microbiol**, v. 52, p. 271 – 275, 2003.

KIDD, S.E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P.J.; CHEN, H.; HINGSTON, A.O.; KRONSTAG, J.W.; BARTLETT, K.H. Characterization of Environmental Sources of the Human and Animal Pathogen, *Cryptococcus gattii*, in British Columbia, Canada, and Pacific Northwest USA. **Appl Environ Microbiol**, v.? 2006.

KIDD, S.E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R.L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K.H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K.J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci**, v. 101, p. 17258–17263, 2004.

KOBAYASHI, C.C.B.A.; SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O.F.L.; BRITO, S.C.A.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.R.R. Characterization Of *Cryptococcus neoformans* Isolated From Urban Environmental Sources In Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.47, p. 203 – 207, 2005.

KRAUS, P.R.; BOILY, M.; GILES, S.S.; STAJICH, J.E.; ALLEN, A.; COX, G.M.; DIETRICH, F.S.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryot Cell**, v.3, p. 1249 – 1260, 2004.

KWONG-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNET, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J Clin Microbiol**, v. 15, p. 535-537, 1982.

LATOUCHE, G.N.; HUYNH, M.; SORRELL, T.C.; MEYER, W. PCR Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the Phospholipase B (PLB1) gene

for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 2080 – 2086, 2003.

LAZERA, M.S.; SALMITO CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**, v. 38, p. 379 – 383, 2000.

LEAL, A.L. Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico dos pacientes com meningite criptocócica no Estado do Rio Grande do Sul. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

LI, A. & WU, S. The phenoloxidase test and its application to identify *Cryptococcus neoformans* with various biological characteristics. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 35, p. 97 – 102, 1995.

LIN, X. & HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 69 – 105, 2006.

LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, p. 1017 – 1021, 2005.

LIN, X.; HUANG, J.C.; MITCHELL, T.G.; HEITMAN, J. Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the *MAT α* alleles enhances filamentation. **PLOS Genetics**, v. 2, p. 1801 – 1814, 2006.

LOFTUS, B.J.; FUNG, E.; RONCAGLIA, P.; ROWLEY, D.; AMEDEO, P.; BRUNO, D.; VAMATHEVAN, J.; MIRANDA, M.; ANDERSON, I.J.; FRASER, J.A.; ALLEN, J.E.; BOSDET, I.E.; BRENT, M.R.; CHIU, R.; DOERING, T.L.; DONLIN, M.J.; D'SOUZA, C.A.; FOX, D.S.; GRINBERG, V.; FU, J.; FUKUSHIMA, M.; HAAS, B.J.; HUANG, J.C.; JANBON, G.; JONES, S.J.; KOO, H.L.; KRZYWINSKI, M.I.; KWON-CHUNG, J.K.; LENGELER, K.B.; MAITI, R.; MARRA, M.A.; MARRA, R.E.; MATHEWSON, C.A.; MITCHELL, T.G.; PERTEA, M.; RIGGS, F.R.; SALZBERG, S.L.; SCHEIN, J.E.; SHVARTSBEYN, A.; SHIN, H.; SHUMWAY, M.; SPECHT, C.A.; SUH, B.B.; TENNEY, A.; UTTERBACK, T.R.; WICKES, B.L.; WORTMAN, J.R.; WYE, N.H.; KRONSTAD, J.W.; LODGE, J.K.; HEITMAN, J.; DAVIS, R.W.; FRASER, C.M.; HYMAN, R.W. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, p. 1321 – 1324, 2005.

MACDOUGALL, L. & FYFE, M. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a novel environment provides clues to its incubation period. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 1851 – 1852, 2006.

MACFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **TRENDS Microbiol**, v. 14, p. 497 – 505, 2006.

MATSUMOTO, M.T.; Tipagem molecular, perfis de sensibilidade e caracterização de cDNA diferencialmente expressos durante a infecção de *Cryptococcus neoformans*. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista, 2006.

MEDEIROS RIBEIRO, A.; SILVA, L.K.; SILVEIRA SCHRANK, I.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; HENNING VAINSTEIN, M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. **Med Mycol**, v. 44, p. 707 – 713, 2006.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; VIVIANI, M.A.; METHLING, K.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M.A.; ELLIS, D.H.; SORREL, T.C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790 – 1799, 1999.

MEYER, W.; CASTANEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTANEDA, E.; ICSG. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis**, v. 9, p. 189 – 195, 2003.

MISSALL, T. A.; PUSATERI, M. E.; LODGE, J. K. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 51, p. 1447 – 1458, 2004.

MISSAL, T.A.; PUSATERI, M.E.; CHAMBERS, K.T.; CORBETT, J.A.; LODGE, J.K. Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. **Eukaryot Cell**, v. 5 p. 518 – 529, 2006.

MITCHELL, T.G. & PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, p. 515 – 548, 1995.

MONTAGNA, M.T.; VIVIANI, M.A.; PULITO, A.; ARALLA, C.; TORTORANO, A.M.; FIORE, L.; BARBUTI, S. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Italy. Note II. Environmental investigation related to an autochthonous clinical case in Apulia. **J Mycol Med**, v. 7, p. 93–96, 1997.

MORAES, E.M.P.; PRÍMOLA, N.S.; HAMDAN, J.S. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four

antifungal drugs determined by two techniques. **Mycoses**, v. 46, p. 164 – 168, 2003.

MUYEMBE TAMFUM, J.J.; MUPAPA KIBADI, D.; NGANDA, L.; NGWALA-BIKINDU, D.; KUEZINA, T.; KELA-WE, I.; VANDEPITTE, J. Cryptococcosis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. A case associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Kinshasa, Zaire. **Med Trop**, v. 52, p. 435 – 438, 1992.

NEUFELD, P.M. **Manual de Micologia médica**: técnicas básicas de diagnóstico. Programa Nacional de Controle de Qualidade, Rio de Janeiro, 1999. 240 p.

NIELSEN, K.; COX, G.M.; WANG, P.; TOFFALETTI, D.L.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. **Infect Immun**, v. 71, p. 4831 – 4841, 2003.

NIELSEN, K.; COX, G.M.; LITVINTSEVA, A.P.; MYLONAKIS, E.; MALLIARIS, S.D.; BENJAMIN, D.K. JR.; GILES, S.S.; MITCHELL, T.G.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. **Infect Immun**, v. 73, p. 4922 – 4933, 2005.

NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, L.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PEREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 73 - 77, 2003.

PANEPINTO, J.; LUI, L.; RAMOS, J.; ZHU, X.; VALYI-NAGY, T.; EKSI, S.; FU, J.; JAFFE, H.A.; WICKES, B.; WILLIAMSON, P.R. The DEAD-box RNA helicase Vad1 regulates multiple virulence-associated genes in *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Invest**, v. 115, p. 632 – 641, 2005.

PASSONI, L.F.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environmental of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med Mycol**, v. 36, p. 305 – 311, 1998.

POLACHECK, I.; HEARING, V.J.; KWON-CHUNG, K.J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 150, p. 1212 – 1220, 1982.

RANDHAWA, H.S.; KOWSHIK, T.; PREETI SINHA, K.; CHOWDHARY, A.; KHAN, Z.U.; 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. **Med Mycol**, v. 44, p. 623 – 630, 2006.

ROSA E SILVA, L.K. Identificação de Genes Regulados pela Temperatura na Levedura Patogênica *Cryptococcus neoformans*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

RUDE, T.H.; TOFFALETTI, D.L.; COX, G.M.; PERFECT, J.R. Relationship of the Glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 70, p. 5684 – 5694, 2002.

RUMA, P.; CHEN, S.C.; SORRELL, T.C.; BROWNLEE, A.G. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. **Lett Appl Microbiol**, v. 23, p. 312 – 316, 1996.

SAAG, M.S.; GRAYBILL, R.J.; LARSEN, R.A.; PAPPAS, P.G.; PERFECT, J.R.; POWDERLY, W.G.; JOBEL, J.D.; DISMUKES, W.E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 30, p. 710 – 718, 2000.

SALAS, S.D.; BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J.; PERFECT, J.R.; WILLIAMSON, P.R. Effect of the lacase gene *CNLAC1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **J Exp Med**, v. 184, p. 377 – 386, 1996.

SCHEIN, J.E.; TANGEN, K.L.; CHIU, R.; SHIN, H.; LENGELER, K.B.; MACDONALD, W.K.; BOSDET, I.; HEITMAN, J.; JONES, S.J.; MARRA, M.A.; KRONSTAD, J.W. Physical maps for genome analysis of serotype A and D strains of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genome Res**, v. 12, p. 1445 – 1453, 2002.

SEO, I.Y.; JEONG, H.J.; YUN, K.J.; RIM, J.S. Granulomatous cryptococcal prostatitis diagnosed by transrectal biopsy. **Int J Urol**, v. 13, p. 638 – 639, 2006.

SICO, J.J. & HUGHES, E. Necrotising cryptococcal vasculitis in an HIV-negative woman. **Mycoses**, v. 49, p. 152 – 154, 2005.

SORRELL, T.C.; CHEN, S.C.A.; RUMA, P.; MEYER, W.; PFEIFFER, T.J.; ELLIS, D.H.; BROWNLEE, A.G. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 1253 – 1260, 1996.

SOUZA, L.K.; FERNANDES, O. DE F.; KOBAYASHI, C.C.; PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; LEMOS, J.A.; SOUZA-JUNIOR, A.H.; SILNA, M. DO R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus*

neoformans in Goiania city, Goias, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 47, p. 253 – 256, 2005.

SOUZA, M.B.; MELO, C.S.N.; SILVA, C.S.; SANTO, R.M.; MATAYOSHI, S. Criptococose palpebral: relato de caso. **Arq Bras Oftalmol**, v. 69, p. 265 – 267, 2006.

STEENBERGEN, J.N.; SHUMAN, H.A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 15245 – 15250, 2001.

SUGIURA, Y.; HOMMA, M.; YAMAMOTO, T. Difficulty in diagnosing chronic meningitis caused by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 76, p. 1460 – 1461, 2005.

SWINNE, D.; DEPPNER, M.; LAROCHE, R.; FLOCH, J.J.; KADENDE, P. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). **AIDS**, v. 3, p. 389 – 390, 1989.

TAY, S.T.; CHAI, H.C.; NA, S.L.; HAMIMAH, H.; ROHANI, M.Y.; SOO-HOO, T.S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. **Mycopathologia**, v. 159, p. 509 – 513, 2005.

TINTELNOT K, LEMMER K, LOSERT H, SCHAR G, POLAK A. Follow-up of epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates. **Mycoses** v. 47, p. 455 – 464, 2004.

TORRES, H.A.; PRIETO, V.G.; RAAD, I.I.; KONTOYIANNIS, D.P. Proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* does not differ clinically from proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-intact *Cr. neoformans*. **Mycoses**, v.48, p. 21 – 24, 2005.

TORTORANO, A.M.; VIVIANI, M.A.; RIGONI, A.L.; COGLIATI, M.; ROVERSELLI, A.; PAGANO, A. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy. **Mycoses**, v. 40, p. 297 – 302, 1997.

TRILLES, L.; LAZERA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B. BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Med Mycol**, v. 41, p. 383 – 390, 2003.

TRILLES, L.; FERNANDEZ-TORRES, B.; LAZERA, M.S.; WANKE, B.; GUARRO, J. In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 4815 – 4817, 2004.

VAN DER HORST, C.M.; SAAG, M.S.; CLOUD, G.A.; HAMILL, R.J.; GRAYBILL, J.R.; SOBEL, J.D.; JOHNSON, P.C.; TUAZON, C.U.; KERKERING, T.; MOSKOVITZ, B.L.; POWDERLY, W.G.; DISMUKES, W.E. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. **N Engl J Med**, v. 337, p. 15 – 21, 1997.

VIVIANI, M.A.; COGLIATI, M.; ESPOSTO, M.C.; LEMMER, K.; TINTELNOT, K.; VALIENTE, M.F.C.; SWINNE, D.; VELEGRAKI, A.; VELHO, R.; ECMM. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 614 – 619, 2006.

WALTON, F.J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel genes functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 57, p. 1381 – 1396, 2005.

WEATHERHEAD, S.C.; CHARLTON, F.G.; REYNOLDS, N.J. Plaques, Papules, and Nodules in a 40-Year-Old Man. **Arch Dermatol**, v. 142, p. 921 – 926, 2006.

WILLIAMSON, P.R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **J Bacteriol**, v. 176, p. 656 – 664, 1994.

WOJCIK-STOPCZYNSKA, B.; FALKOWSKI, J.; JAKUBOWSKA, B. Air microflora of university cafeteria. **Rocz Panstw Zakl Hig**, v. 54, p. 321 – 328, 2003.

ZHANG, D.; YANG, Y.; CASTLEBURY, L. A. & CERNIGLIA, C. E. A method for the large scale isolation of high transformation. **FEMS Microbio Lett**, v. 145, p. 261-265, 1996.

ZHU, X. & WILLIAMSON, P.R. A CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 50, p. 1271 – 1282, 2003.

ZHU, X., & WILLIAMSON, P.R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, p. 1 – 10, 2004.

ANEXOS

Anexo 1. Esquema de diluição das drogas solúveis e insolúveis em água. M27-A2, 2002 – CLSI.

Drogas solúveis em água (fluconazol e 5-fluorocitosina)						
Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Meio	Concentração Intermediária (µg/mL)	Concentração Final (1:10) (µg/mL)
1	10240	Estoque	1,0	7,0	1280	128
2	1280	Passo 1	1,0	1,0	640	64
3	1280	Passo 1	1,0	3,0	320	32
4	320	Passo 3	1,0	1,0	160	16
5	320	Passo 3	0,5	1,5	80	8
6	320	Passo 3	0,5	3,5	40	4
7	40	Passo 6	1,0	1,0	20	2
8	40	Passo 6	0,5	1,5	10	1
9	40	Passo 6	0,5	3,5	5	0,5
10	5	Passo 9	1,0	1,0	2,5	0,25

A concentração da placa será a metade da concentração final (1:10), devido a adição do inóculo.

Drogas insolúveis em água (anfotericina B e itraconazol)						
Passo	Concentração (µg/mL)	Fonte	Volume (mL)	Meio	Concentração Intermediária (µg/mL)	Concentração Final (1:10) (µg/mL)
1	3200	Estoque			3200	32
2	3200	Estoque	0,5	0,5	1600	16
3	3200	Estoque	0,5	1,5	800	8
4	3200	Estoque	0,5	3,5	400	4
5	400	Passo 4	0,5	0,5	200	2
6	400	Passo 4	0,5	1,5	100	1
7	400	Passo 4	0,5	3,5	50	0,5
8	50	Passo 7	0,5	0,5	25	0,25
9	50	Passo 7	0,5	1,5	12,5	0,125
10	50	Passo 7	0,5	3,5	6,25	0,0625

A concentração da placa será a metade da concentração final (1:10), devido a adição do inóculo.

CAPÍTULO III – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE OUTRAS LEVEDURAS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leveduras

As leveduras são microrganismos pertencentes ao reino Fungi, as quais possuem parede celular rígida, núcleo individualizado, reprodução sexuada através de células denominadas esporos, nutrição heterotrófica por absorção, ausência de motilidade, entre outras. Possuem um talo predominantemente unicelular, realizam reprodução assexuada por brotamento ou fissão e não formam corpos de frutificação, o que as diferencia dos demais fungos (KURTZMANN & FELL, 1998). As leveduras estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em vários substratos. São classificadas entre os filos Ascomycota e Basidiomycota (CAVALIER-SMITH, 1998; BARNETT *et al.*, 2000). Os basidiomicetos são capazes de utilizar uma grande variedade de compostos se comparados aos ascomicetos. Isso se deve ao amplo perfil assimilativo de fontes de carbono que os basidiomicetos possuem, diferente dos ascomicetos, que se restringem a poucas fontes de carbono (KURTZMANN & FELL, 1998). Atualmente sabe-se que espécies de ambos os filos são amplamente distribuídas, habitando desde solos, rios, lagoas, árvores, frutos até o interior do corpo humano e de animais (SOARES *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1999; KAM & XU, 2002; HONG *et al.*, 2006; CAFARCHIA *et al.*, 2006).

As leveduras são utilizadas na indústria química, farmacêutica, têxtil e alimentícia, em processos de fermentações, produções de enzimas e ainda na produção de substâncias que servem como antimicrobianos (KOENIG & DAY, 1989; SANTOS *et al.*, 2002; FUENTEFRIA, 2004; LAITJILA *et al.*, 2006; LOPANDICK *et al.*, 2006). Porém com o aumento de micoses oportunistas envolvendo leveduras, esses microrganismos passaram a ter uma atenção diferenciada. Leveduras que são comumente usadas na produção de alimento

e fermentação, como *Saccharomyces* e *Pichia* spp., agora possuem casos clínicos relatados na literatura (HOFMEYR & SLAVIN, 2006).

1.2 Micoses emergentes

Com a possibilidade de transplantes de órgãos, tratamentos oncológicos intensos e tratamentos utilizando corticóides a sobrevivência de muitos pacientes têm aumentado, juntamente com uma prolongada permanência em unidades de saúde. Esses tratamentos promovem a baixa do sistema imune do paciente, deixando-o suscetível a diversos patógenos oportunistas, principalmente os fungos. Por esse motivo, as infecções fúngicas têm se tornado um grande problema de saúde pública. Várias espécies fúngicas, que antes eram consideradas inofensivas ao homem vêm tornando-se potenciais patógenos, causando as chamadas micoses emergentes. As leveduras vêm se destacando nesse quadro pelo modo ao qual infectam o hospedeiro, por suas defesas contra o sistema imune dos hospedeiros e por serem amplamente distribuídas no ambiente.

Do filo Basidiomycota, os gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* são os mais citados em micoses oportunistas (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; THANOS *et al.*, 2006; KOYANAGI *et al.*, 2006; KIKEN *et al.*, 2006; KHAWCHAROENPOM *et al.*, 2006; GIL *et al.*, 2006). As espécies do filo Ascomycota possuem várias descrições de envolvimento em casos de infecções oportunistas, principalmente as do gênero *Candida*, as quais possuem inúmeros casos clínicos relatados (LUZZATI *et al.*, 2005; BASSETTI *et al.*, 2006; YAPAR *et al.*, 2006). Outros gêneros com descrição de caso clínico na literatura são: *Pichia*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, entre outros (MOHL *et al.*, 1998; WONG *et al.*, 2000; WAGNER *et al.*, 2005; PAULA *et al.*, 2006; TAJ-ALDEEN *et al.*, 2006). Essas micoses variam de cutâneas a sistêmicas, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Atualmente a espécie *C. neoformans*, que antes era citada como oportunista, vêm acometendo indivíduos aparentemente hígidos (LUI *et al.*, 2006). Isso se deve a linhagens resistentes aos antifúngicos e a diversos estresses ambientais. Essas linhagens desenvolvem mecanismos internos que

atuam como potenciais fatores de virulência antes não existentes (ALTAMURA *et al.*, 2001).

O modo de infecção não está descrito para todos os fungos. Os eventos que levam a uma infecção fúngica geralmente incluem a entrada do patógeno no organismo hospedeiro, o que geralmente ocorre por inalação de esporos ou de leveduras dissecadas, ou ainda por feridas cutâneas. Após a entrada, o ataque do fungo ao tecido hospedeiro, para estabelecimento e, em muitos casos, a disseminação pelo organismo hospedeiro, que ocorre via hematogênica (ALTAMURA *et al.*, 2001). Como citado anteriormente, as leveduras estão dispersas pelo ambiente estando em contato direto com humanos e animais, causando preocupação a área da saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Baseado em um relato de caso clínico de criptococose, isolar leveduras de uma Madeireira localizada na cidade de Cachoeira do Sul – RS.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar leveduras de substratos da Madeireira e identificá-las fenotipicamente;
- Caracterizar a microbiota leveduriforme existente na Madeireira e avaliar a quais outras micoses os trabalhadores desse local estão sujeitos.
- Utilizar o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA para confirmar a identificação fenotípica das espécies com caso clínico descrito na literatura e para identificar as leveduras que não puderam ser identificadas pelos métodos tradicionais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram realizadas 4 coletas, uma em cada estação do ano, em uma Madeireira na cidade de Cachoeira do Sul – RS. As coletas foram realizadas nos meses de maio (outono), julho (inverno), outubro (primavera) e dezembro (verão), respectivamente, no ano de 2005.

Foram coletadas amostras de serragem, pó de madeira e poeira do interior da Madeireira, de casca e folhas de troncos de eucalipto localizados na área externa da Madeireira e de excretas secas de pombos e galinhas encontradas próximas à Madeireira. Todas as amostras foram coletadas com o auxílio de espátulas estéreis e acondicionadas em placas de Petri estéreis para o transporte ao laboratório.

Em cada coleta foi realizado o monitoramento do ar, conforme descrito por Wojcik-Stopczynska *et al.* (2003) com modificações. O monitoramento foi realizado no interior da Madeireira utilizando - se 10 placas de Petri contendo Agar YEPG (Tabela 1), adicionado de cloranfenicol (34µg/mL), por coleta. As placas eram dispostas em locais demarcados, a um metro de distância da parede, do chão e do teto, e permaneciam abertas por uma hora. Após a exposição eram fechadas, lacradas e transportadas ao laboratório, onde eram mantidas em estufa bacteriológica a 30°C e examinadas diariamente por até 10 dias para o aparecimento de colônias.

3.2 Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado segundo o protocolo descrito por Passoni *et al.* (1998) com modificações. Das amostras de serragem, pó de madeira, poeira, folhas e cascas de eucalipto foram pesados 0,3g de material e transferidas para 15mL de solução salina a 0,9%. Das amostras de excretas de aves foram pesados 0,1g e também transferidas para cada 15mL de solução salina a 0,9%. Todas as amostras foram colocadas em

frascos Erlenmeyers e submetidas à agitação (150rpm) em shaker por 1 h. Após esse período foram mantidas sem agitação por 15 min para ocorrer a sedimentação e 100µL do sobrenadante foram coletados para semeadura em placas de Petri contendo Agar YEPG acrescido de cloranfenicol (34µg/mL). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C e examinadas diariamente por 10 dias para o aparecimento de colônias.

3.3 Isolamento e identificação das leveduras ambientais

Todas as leveduras isoladas neste estudo foram fenotipicamente caracterizadas por testes morfológicos e fisiológicos (YARROW, 1998). A identificação das leveduras foi realizada conforme Barnett *et al.* (2000) e pelo software YEASTCOMPARE (C. Ciriello & M.A. Lachance, Copyright © 1999 – 2001), que compara as características fenotípicas das leveduras com espécies conhecidas, aprimorando o trabalho de identificação.

3.3.1 Isolamento e Manutenção das culturas

O isolamento das leveduras foi realizado mediante o crescimento de colônias sobre o meio, as quais eram selecionadas por diferenças macromorfológicas na mesma placa. Após a seleção visual, cada levedura era semeada em outra placa contendo Agar YEPG, para eliminar qualquer contaminante (fungos filamentosos ou bactérias). As culturas puras foram estocadas em Agar GYMP com óleo mineral a 4°C.

Obtidas as colônias puras, cada uma foi repicada para 2 tubos, um contendo Agar Gymp (Tabela 1), onde após o crescimento de 3 dias foi adicionado óleo mineral estéril e mantido a 4°C, sendo esse o tubo estoque; e o outro contendo Agar YEPG, para ser utilizado nos posteriores testes fenotípicos. Foram efetuados repiques sucessivos a cada 8 meses.

3.3.2 Caracterização morfológica

A identificação morfológica foi realizada por análise macro e micromorfológica de cada levedura isolada. A análise macromorfológica foi feita mediante observação de características específicas das colônias, tais como: textura, superfície, coloração, borda, elevação e forma. Já a análise micromorfológica foi realizada em microscópio óptico (Zeiss – Axiostar), com magnificação de 1000X. Analisou-se microscopicamente o padrão e a forma apresentada, tipo de reprodução vegetativa (por brotamento multilateral, bipolar ou unipolar, por fissão, por formação de filamentos), e a formação e estrutura de ascósporos, se estes fossem encontrados (BARNETT *et al.*, 2000).

Para a análise macromorfológica, as leveduras eram cultivadas em Agar YEPG por 4 dias; já na análise micromorfológica as leveduras foram crescidas em Agar YM (Tabela 1), por 2 a 4 dias. Para a análise da formação dos ascósporos, as leveduras foram crescidas em Agar Acetato de Sódio (Tabela 1) e visualizadas em 6, 15 e 30 dias de crescimento, dependendo do resultado observado em cada visualização.

3.3.3 Caracterização Bioquímica

Para identificação bioquímica, foram realizados testes de Fermentação de açúcares, testes de Assimilação de Fontes de Carbono e Fontes de Nitrogênio, conforme descrito por Barnett *et al.* (2000).

Tradicionalmente, três principais métodos são utilizados para a inoculação e posterior leitura dos testes bioquímicos e também em outros testes de identificação: o método com meio líquido, sendo a leitura pelo cartão de Wickerham, auxanograma em placas com Agar base nitrogenado e, por fim, o método de réplica em placas (BARNETT *et al.*, 2000). No presente trabalho, foi utilizado o método de meio líquido para os testes de Assimilação de Fontes de Carbono e para os inóculos preparados anteriormente aos testes. Para os testes de Assimilação de Fontes de Nitrogênio utilizou-se o método de réplica em placas.

O método de meio líquido, utilizando o cartão de Wickerham estima a densidade celular através da turvação da suspensão onde foi inoculada a

levedura. O grau 1 da escala de Wickerham equivale a uma concentração entre 10^5 e 10^6 células/mL; o grau 2 equivale a 10^7 e 10^8 células/mL e o grau 3 é equivalente acima de 10^8 células/mL (PFALLER *et al.*, 1988).

O método de réplica em placas consiste em avaliar o crescimento da levedura na superfície de um Agar contendo uma fonte de nitrogênio ou carbono. As inoculações são feitas com um padrão sobre o Agar, sendo idênticas para todas as fontes testadas e controles utilizados. O resultado é dado comparando-se visualmente o crescimento da fonte de nitrogênio ou carbono desejada com o crescimento obtido nos controles positivo e negativo (LEDERBERG & LEDERBERG, 1952; SHIFRINE *et al.*, 1954; BEECH *et al.*, 1955).

3.3.3.1 Testes de Fermentação

Os testes para verificar a capacidade de cada levedura fermentar açúcares foram realizados conforme descrito por Yarrow (1998) e Barnett *et al.* (2000). Foram testados os açúcares D-glicose (Acros), galactose (Acros) e maltose (Sigma). As leveduras foram inoculadas em Agar YEPG e incubadas por 48 h a 30°C antes da realização dos testes para obtenção de cultura metabolicamente ativa. Após esse período foi realizado um inóculo abaixo do grau 1 do cartão de Wickerham em tubos com água destilada estéril e deste, foi retirado 30µL os quais foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio para fermentação (Tabela 1) e tubos de Durham invertidos no seu interior. A leitura foi realizada regularmente em 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14 e 21 dias após a inoculação. O teste foi considerado negativo quando não houve acúmulo de gás no interior do tubo Durham ou quando eram observadas apenas pequenas bolhas. Quando 1/3 do tubo Durham estava ocupado por gás foi considerado +1, quando ocupado por 2/3 de gás considerou-se +2 e quando o tubo Durham estava completo de gás, +3. As cepas cujas leituras registraram-se +2 ou +3 foram consideradas fermentadoras, já as que tiveram leitura +1 foram consideradas fermentadoras fracas.

Como controle positivo para o teste de fermentação, foi utilizado uma linhagem de *Candida albicans* para o açúcar glicose e uma linhagem de *Candida tropicalis* para os demais açúcares (linhagens pertencentes à coleção do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica).

3.3.3.2 Testes de Assimilação de Fontes de Carbono

Esse teste avalia a capacidade da levedura assimilar determinada fonte de carbono anaerobicamente e foi realizado conforme descrito por Yarrow (1998). Foram testadas 13 fontes de carbono (D-glicose [Acros], N-acetilglicosamina [Sigma], D-trealose [Sigma], galactose [Acros], D-raffinose [Sigma], celobiose [Sigma] amido [Sigma], lactose [Merck], Myo-inositol [Sigma], D-mannitol [Synth], maltose [Sigma], D-arabinose [Merck], xilose [Sigma]) para cada levedura. O inóculo foi preparado em água destilada estéril abaixo da escala 1 de Wickerham, com culturas de 48 h em Agar YEPG, o qual era incubado por 48 h a 30°C para que esgotassem as fontes energéticas endógenas. Após esse período, uma alíquota de 30µL era inoculada em tubos, cada qual com uma fonte de carbono e incubados a 30°C por 21 dias. A leitura foi realizada em 7, 14 e 21 dias, através do cartão de Wickerham, comparando a turbidez obtida para cada fonte de carbono, a apresentada pelos controles positivo e negativo (PFALLER *et al.*, 1988). Para a realização dos testes foram utilizados tubos com 2mL contendo 0,67% do meio YNB (Yeast Nitrogen Base – Difco) e 0,5% da fonte de carbono (1% para D-raffinose).

Os controles, positivo e negativo deste teste, foram os tubos contendo YNB + glicose e o tubo contendo YNB sem nenhuma fonte de carbono, respectivamente.

3.3.3.3 Testes de Assimilação de Fontes de Nitrogênio

Semelhante ao teste de assimilação de fontes de carbono, esse teste visa testar aerobicamente a habilidade da levedura crescer utilizando nitrato, ou outros compostos nitrogenados, como única fonte de nitrogênio, conforme descrito por Yarrow (1998). Aproximadamente ¼ de todas as espécies de leveduras utilizam nitrato e essa habilidade é importante para identificação das mesmas. Foram testadas 4 fontes de nitrogênio (nitrato de potássio [Quimex], nitrito de sódio [Reagen], L-lisina [Sigma], etilamina [Sigma]) para cada levedura isolada. O inóculo era preparado em água destilada estéril abaixo da escala 1 de Wickerham, com culturas de 48 h em Agar YEPG, o qual era incubado por 48 h a 30°C para que esgotassem as fontes energéticas. Pelo método de replica em placas, foram preparadas placas de Petri contendo 1,17% de YCB (Yeast Carbon Base - Difco), 0,5% da fonte de nitrogênio

desejada (com exceção da Etilamina, a qual foi utilizada na concentração de 0,064%) e 2% de Agar Ultra Puro [Sigma] (Tabela 1). Por placa, eram inoculadas na superfície 20 leveduras, a partir do pré-inóculo descrito anteriormente, de maneira uniforme e idêntica para todas as placas. De cada levedura era depositado 4µL na superfície do Agar, e após total absorção, as placas eram incubadas por 6 dias a 30°C. A leitura foi feita visualmente através do crescimento, comparado com os controles.

Para controle positivo foi utilizada uma placa contendo YCB + Peptona e como controle negativo, somente YCB.

3.3.3.4 Atividade de Urease

Para esse teste foi utilizado o Agar Uréia de Christensen (Tabela 1), onde a atividade da enzima urease pode ser observada pela mudança de coloração do indicador de pH vermelho de fenol de laranja para rosa, com a mudança do pH de ácido para básico, sendo este o resultado positivo (NEUFELD, 1999; BARNETT *et al.*, 2000). As culturas foram inoculadas sobre o Agar Uréia de Christensen e incubadas a 30°C por seis dias, sendo examinadas diariamente.

3.3.3.5 Produção de Caseinase

Algumas leveduras têm a habilidade de produzir enzimas específicas; a habilidade de produção de caseinase foi testada para todas as leveduras isoladas. O teste foi feito em placas de Petri grande contendo 0,67% de YNB acrescido de 0,5% de glicose, 0,5% de caseína [Sigma] e 2% de Agar [Merck], ajustado para o pH 7,0 com KOH (Tabela 1). Foi realizado um inóculo de cada levedura abaixo do grau 1 da escala de Wickerham e desse foi tirado 4µL e depositado sobre o meio, com distâncias eqüidistantes entre os inóculos. Após sete dias de incubação a 30°C, era realizada a revelação, com adição de HCl 1N na superfície do meio, deixando agir com a caseína por 1 h. O resultado foi considerado positivo quando ao redor do inóculo surgiu um halo transparente, resultado da hidrólise de caseína (YARROW, 1998).

3.3.4 Caracterização Fisiológica

3.3.4.1 Teste de Crescimento em Diferentes Temperaturas

As leveduras crescem em uma ampla faixa de variação térmica, a qual vai de 0° a 47°C, portanto este teste contribui para a identificação de algumas leveduras. Foi realizado o teste com as temperaturas de 37°C e 42°C, pois as leveduras deste trabalho foram isoladas a 30°C. Foi preparado um inóculo de cada levedura abaixo do grau 1 da escala de Wickerham e desse foram retirados 30µL, que foram inoculados em caldo YEPG e submetidos em banho-maria, às temperaturas citadas anteriormente. A leitura era realizada diariamente por quatro dias e medida pelo grau de turvação com a escala de Wickerham (KREGGER-VAN RIJ, 1984; YARROW, 1998; BARNETT *et al.*, 2000).

3.3.4.2 Teste de Crescimento a Alta Pressão Osmótica

Algumas espécies de leveduras são tolerantes de crescimento a soluções hipertônicas, sendo esta outra prova importante para a identificação fisiológica. Para realizar esse teste foram feitas duas soluções salinas hipertônicas: NaCl 10 e 16% [Merck]; e uma solução glicosilada hipertônica: Glicose 50%. Foi preparado um inóculo de cada levedura abaixo do grau 1 da escala de Wickerham e desse foram retirados 30µL os quais foram inoculados em caldo YEPG acrescido de 10% e 16% de NaCl e na solução de glicose 50% (0,67% de YNB, 50% de glicose) (Tabela 1). Após a inoculação os tubos foram incubados em banho-maria por 4 dias. A leitura foi realizada pelo grau de turvação medida pela escala de Wickerham (BARNETT *et al.*, 2000).

3.3.5 Identificação Molecular

A identificação molecular, por sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA, foi realizada conforme descrito por Kurtzman & Robnett (1998) e Fell *et al.* (2000). Essa região é altamente conservada e encontra-se seqüenciada em praticamente todas as espécies de leveduras conhecidas, capacitando estudos de taxonomia.

3.3.5.1 Extração de DNA e Amplificação da região D1/D2

A extração de DNA e a amplificação da região D1/D2 do 26S do rDNA foram feitas conforme protocolo descrito por Ramos *et al.* (2001), utilizando os primers NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (O'DONNELL, 1993). As leveduras foram cultivadas em Agar YEPG por 4 dias. Foram retiradas 4 alças e colocadas em eppendorf (2mL) contendo 500µL de tampão de lise celular (0,15M NaCl / 50mM Tris-HCl / 10mM EDTA/ 2% SDS / pH = 8,0) e colocadas em banho-maria a 65°C por 1 h. Foram realizadas uma extração com fenol/ clorofórmio (1:1) e 3 extrações sucessivas com clorofórmio (400µL). O sobrenadante final foi precipitado com isopropanol (200µL) por 5 min a temperatura ambiente. O pellet foi lavado com etanol 70% e após secagem os ácidos nucléicos foram ressuspensos em 50µL de TE (10mM Tris-HCl [pH = 7,6]; 1mM EDTA [pH = 8,0]) e tratados com RNase A (20µg/mL) por incubação em banho-maria por 30 minutos a 37°C. O DNA foi migrado em gel de agarose 0,8% a 100 volts por 1 h e visualizado em luz UV para a quantificação.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo: 3µL de DNA genômico (50ng/µL); 2,5µL de tampão 10X (10 mM Tris HCl pH 8,3/ 50 mM KCl/ 1,5 mM MgCl₂); 1,25µL de MgCl₂ (50mM); 2,5 µL de dNTP (1mM); 1µL de cada *primer* (NL1/ NL4) e 0,5µL de Taq-polimerase (5U/µL - CenBiot Enzimas). Todas as reações foram realizadas em um termociclador (MiniCycler™, MJ Research). A amplificação foi realizada em 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 52°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min. O DNA amplificado foi purificado com tRNA (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante.

3.3.5.2 Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA

O DNA purificado foi usado para sequenciamento com os primers NL-1 e NL-4. As reações de sequenciamento foram realizadas em triplicata para cada *primer*. Foram analisadas 4, 5 ou 6 seqüências de cada isolado, sendo no mínimo 2 seqüências para cada *primer*. As reações do sequenciamento foram realizadas utilizando o kit DYEnamic ET dye Terminator cycle sequencing (Amersham) e analisadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham). A qualidade das seqüências foi verificada pela inspeção dos

cromatogramas utilizando os programas STADEN (STADEN *et al.*, 2000). A seqüência consenso gerada foi comparada com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLASTn para a identificação das espécies (ALTSCHUL *et al.*, 1990). A significância do resultado foi baseada em valores de *E* value 0.0 e de Score maiores que 800 bits.

3.4 Meios de Cultivo e Soluções

Os meios utilizados para o desenvolvimento dos testes estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Meios de cultivo e soluções empregados para realização dos testes.

Agar GYMP	2% glicose; 2% de extrato de malte; 0,5% de extrato de levedura; 0,2% de fosfato de sódio monobásico; 2% Agar
Agar Uréia de Christensen	1% peptona, 1% Glicose, 5% NaCl, 2% Fosfato monopotássico, 0,012% Vermelho de Fenol, 3% Uréia.
Agar YM	0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona; 1% glicose; 2% Agar; 0,003% azul de metileno
Agar YEPG	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 2% Agar.
Caldo YEPG	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura
Meio para fermentação de açúcares	0,75% peptona; 0,45% de extrato de levedura; 2% de cada açúcar (glicose / galactose / maltose)
Meio para a assimilação de fontes de carbono	0,67% Yeast Nitrogen Base (YNB); 2% Agar Difco; 0,5% fonte de carbono (1% para rafinose)
Meio para a assimilação de fontes de nitrogênio	1,17% de Yeast Carbon Base (YCB); 0,5% Fonte de nitrogenio (0,064% ethilamina); 2% Agar Ultra-puro
Meio para a observação de ascósporos	0,5% acetato de sódio trihidratado; 2% Agar
Meio para produção de caseinase	0,67% de YNB; 0,5% de glicose; 0,5% de caseína; 2% Agar, ajustado para o pH 7,0 com KOH
Solução Salina	NaCl 0,9% ou 0,85%.
Teste de resistência a NaCl 10 e 15%	2% glicose; 1% de peptona; 0,5% extrato de levedura; 2% Agar; 10 ou 15% de NaCl
Teste de resistência a 50% de glicose	0,67% de YNB; 50% glicose

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e purificação das culturas

Das quatro coletas realizadas foram isoladas 180 leveduras a partir de características macromorfológicas distintas por placa. As amostras coletadas totalizaram 40 sítios amostrais do ar interno da madeireira, 40 amostras de excretas coletadas (pombos e galinhas) e 63 amostras no interior da madeireira, entre serragem, pó de madeira, poeira, casca de eucalipto e folha de eucalipto. A maioria das leveduras foi isolada a partir do monitoramento do ar, realizado no interior da Madeireira. Outro sítio amostral com grande número de isolados foram das excretas de aves existentes no local. Dos demais sítios avaliados foram obtidos poucos isolados (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição do número amostral em relação ao número de leveduras isoladas em cada sítio.

Sítio amostral	Amostragem total em cada sítio amostral	Número de leveduras isoladas em cada sítio amostral
Monitoramento do ar	40	76
Excreta de pombo	20	36
Excreta de galinha	20	9
Serragem	15	22
Pó de madeira	13	16
Poeira	12	10
Casca de eucalipto	22	8
Folha de eucalipto	1	3

Foi realizada uma coleta por estação do ano, para avaliar a prevalência de gêneros e espécies de leveduras por estação. A maioria das leveduras foi isolada na primavera como esperado, seguida pelo inverno, verão e o outono. No outono foi obtido um menor número de isolados possivelmente devido a falta de experiência na coleta e isolamento. A relação de gêneros isolados em cada estação do ano está representada na tabela 3. Espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida* e *Pichia* foram isoladas em todas as estações. O gênero *Debaryomyces* foi isolado em todas as estações, exceto no outono. Os

demais gêneros foram isolados com menor frequência se comparado aos citados anteriormente. Essa avaliação se refere somente aos isolados que foram identificados ao nível mínimo de gênero com a identificação fenotípica.

Tabela 3. Frequência dos gêneros isolados em cada estação do ano.

Gêneros	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Basidiomicetos	34% (10)*	42% (12)*	3% (1)*	21% (6)*
<i>Cryptococcus</i> spp.	2	2	1	4
<i>Kockovaella</i> sp.	-	-	-	1
<i>Rhodotorula</i> spp.	4	8	-	-
<i>Pseudozyma</i> sp.	1	-	-	-
<i>Sporobolomyces</i> spp.	-	1	-	1
<i>Trichosporon</i> spp.	3	1	-	-
Ascomycetos	39% (44)*	20% (23)*	6% (7)*	35% (40)*
<i>Candida</i> spp.	9	9	5	9
<i>Debaryomyces</i> spp.	11	2	-	15
<i>Hanseniaspora</i> spp.	3	-	-	-
<i>Kluyveromyces</i> spp.	2	1	-	-
<i>Kodamaea</i> spp.	1	-	-	1
<i>Lipomyces</i> spp.	1	-	-	1
<i>Pichia</i> spp.	13	11	2	14
<i>Saccharomyces</i> spp.	2	-	-	-
<i>Torulaspora</i> sp.	-	1	-	-
<i>Williopsis</i> sp.	1	-	-	-
<i>Zygozoma</i> sp.	1	-	-	-

*Número de leveduras isoladas em cada estação do ano.

4.2 Identificação Fenotípica das leveduras isoladas

As características macromorfológicas e micromorfológicas das leveduras isoladas neste estudo podem ser avaliadas no apêndice 1. Os resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos realizados para a identificação fenotípica das leveduras isoladas estão disponíveis nos apêndices 2 e 3, respectivamente.

Das 180 leveduras isoladas, 28 foram classificadas como pertencentes ao Filo Basidiomycota, 115 pertencentes ao Filo Ascomycota e 37 não se enquadraram em nenhum gênero pelos métodos convencionais de identificação. As listagens com a identificação presuntiva das leveduras, assim como a origem de onde foram isoladas estão apresentadas nos apêndices 4 e 5. Os basidiomicetos isolados estão enquadrados em 6 diferentes gêneros e 16 diferentes espécies (Figura 1). Já os ascomicetos englobam 11 distintos gêneros e 32 espécies diferentes (Figura 2).

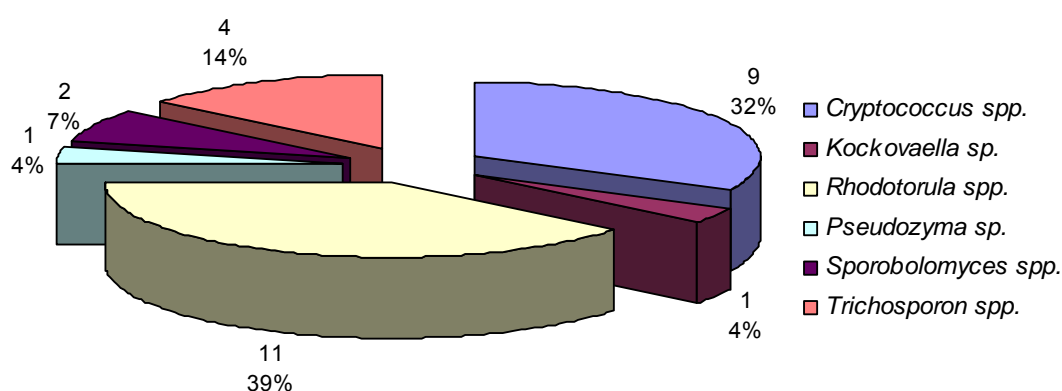


Figura 1. Representação dos isolados pertencentes ao Filo Basidiomycota.

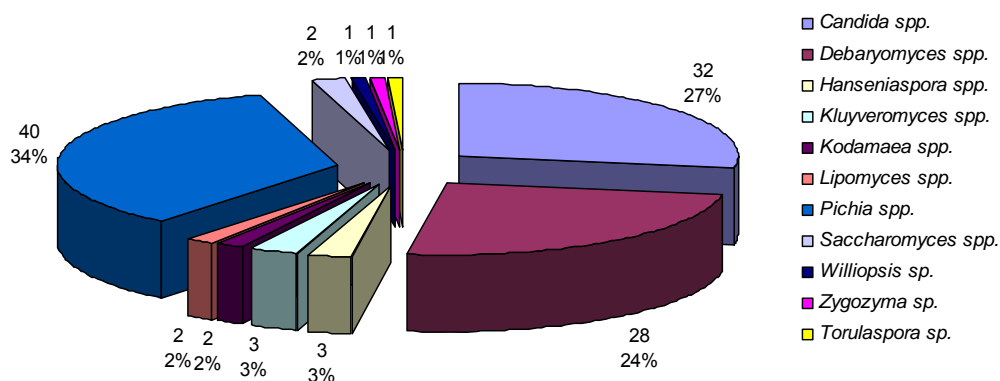


Figura 2. Representação dos isolados pertencentes ao Filo Ascomycota.

Para alguns isolados, só foi possível chegar à identificação de gênero com os testes tradicionais e estes estão seguidos pelo sufixo “sp.”. O sufixo “-?” indica que o isolado é semelhante à determinada espécie, porém difere da

descrição da linhagem tipo desta espécie e devem ser repetidos os testes para confirmação.

4.3 Espécies de leveduras com caso clínico descrito

Após a identificação fenotípica das leveduras isoladas, foi realizada uma busca no Pubmed (www.pubmed.gov), para verificar o envolvimento dessas espécies isoladas da Madeireira em casos clínicos. Essa busca nos possibilitou o conhecimento das demais doenças a que os trabalhadores dessa Madeireira estão sujeitos por estarem expostos a essas espécies. Os resultados da busca estão dispostos na tabela 3, apresentando dois artigos por espécie.

Tabela 4. Espécies com relato de caso clínico na literatura.

Espécie	Caso Clínico
<i>Candida intermedia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Oral <i>Candida</i> flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 99, p. 425 – 431, 2004. • Chronic lymphatic leukemia resistant to radiotherapy and chemotherapy associated with pulmonary mycosis (by <i>Candida intermedia</i>). Riforma Med, v. 13, p. 171 – 174, 1954.
<i>Candida sake</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Significance of oral <i>Candida</i> infections in children with cancer. Pathol Oncol Res, v. 12, p. 237 – 241, 2006. • <i>Candida sake</i>: a relevant species in the context of HIV-associated oropharyngeal candidosis? J Mol Med, v. 76, p. 70 – 73, 1998.
<i>Cryptococcus laurentii</i> *	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of <i>Cryptococcus laurentii</i> meningitis in a patient with HIV infection: a case report and review of the literature. Hawaii Med J, v. 65, p. 260 – 263, 2006. • Cutaneous infection by <i>Cryptococcus laurentii</i>. Br J Dermatol, v. 97, p. 221 – 223, 1977.
<i>Cryptococcus luteolus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Diffuse infiltration of the lungs associated with <i>Cryptococcus luteolus</i>. Lancet, v. 270, p. 1043 – 1045, 1956. • <i>Cryptococcus luteolus</i> as a cause of pulmonary mycosis. Orv Heti, v. 96, p. 687 – 691, 1955.
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Breakthrough invasive infection due to <i>Debaryomyces hansenii</i> (teleomorph <i>Candida famata</i>) and <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin B and caspofungin for suspected

- aspergillosis. *Infection*, v. 33, p. 397 – 400, **2005**.
- Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *J Clin Microbiol*, v. 16, p. 545 – 548, **1982**.
- Kodamaea ohmeri***
- *Kodamaea (Pichia) ohmeri* fungaemia in a premature neonate. *J Med Microbiol*, v. 55, p. 237 – 239, **2006**.
- Pichia fabianii***
- Infection in a neonate caused by *Pichia fabianii*: importance of molecular identification. *Med Mycol*, v. 44, p. 185 – 187, **2006**.
- Rhodotorula mucilaginosa*
- *Rhodotorula mucilaginosa* outbreak in neonatal intensive care unit: microbiological features, clinical presentation, and analysis of related variables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 25, p. 193 – 196, **2006**.
 - Fungemia caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in relation to total parenteral nutrition. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 10, p. 543 – 546, **1992**.
- Trichosporon asahii**
- *Trichosporon asahii*. Blood-stream infection in a non-cancer patient receiving combination antifungal therapy. *Ulster Med J*, v. 75, p. 226 – 227, **2006**.
 - Disseminated infection with *Trichosporon asahii*. *Mycoses*, v. 39, p. 195 – 199, **1996**.

*mais de 10 artigos de caso clínico relatados para tal espécie.

**única descrição de caso clínico.

4.4 Identificação Molecular

Com base na busca realizada no Pubmed e nos resultados da identificação fenotípica, foram submetidas ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA 25 espécies identificadas no presente estudo, com relato clínico na literatura e 37 leveduras não identificadas pelos testes fenotípicos realizados. Até o momento foram seqüenciadas e analisadas 27 leveduras, as quais estão apresentadas na tabela 4. As linhagens 62b, 45c, MA28a, Ep1b, MA21a e MA68d apresentaram homologia com seqüências depositadas no banco de dados referentes a gêneros, sem espécie descrita até o momento, sendo possíveis candidatos a novas espécies.

Tabela 5. Linhagens de leveduras seqüenciadas e analisadas até o momento.

Linhagem	Identificação fenotípica	Identificação molecular	Score (bits)
62b	Sem identificação	<i>Aureobasidium sp. CECT 11965*</i>	1130
45c	Sem identificação	<i>Basidiomycete yeast sp.*</i>	1086
MA30c	Sem identificação	<i>Candida fennica</i>	896
E15c	Sem identificação	<i>Candida pararugosa</i>	940
MA12d	Sem identificação	<i>Candida pomicola</i>	1074
MA5d	Sem identificação	<i>Candida pomicola</i>	1090
MA27b	Sem identificação	<i>Candida railenensis</i>	1059
50b	Sem identificação	<i>Candida railenensis</i>	1090
MA28a	Sem identificação	<i>Cryptococcus sp. CBS 8368*</i>	1158
MA68d	Sem identificação	<i>Cryptococcus sp. CBS 8368*</i>	1067
MA28b	Sem identificação	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1084
MA30a	Sem identificação	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	993
Ep1b	Sem identificação	<i>Debaryomyces sp. YS DN2*</i>	1041
MA21a	<i>Cryptococcus sp.</i>	<i>Debaryomyces sp. YS DN2*</i>	1110
27 ^a	Sem identificação	<i>Pichia anomala</i>	1019
43 ^a	Sem identificação	<i>Pichia anomala</i>	1065
MA42d	Sem identificação	<i>Pichia burtonii</i>	894
20 ^a	Sem identificação	<i>Pichia myanmaensis</i>	1031
Ep4b	Sem identificação	<i>Rhodospordium toruloides</i>	971
MA44b	Sem identificação	<i>Rhodospordium toruloides</i>	1061
30 ^a	Sem identificação	<i>Rhodospordium toruloides</i>	997
Ep1c	Sem identificação	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1108
Ep17b	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1102
45b	<i>Cryptococcus ater</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	999
MA50c	Sem identificação	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	1160
33c	Sem identificação	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	1037
MA48b	Sem identificação	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	1172

* Possíveis espécies novas.

5 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido a partir do caso clínico descrito no capítulo I. Procurou-se traçar um perfil epidemiológico das leveduras existentes na Madeireira onde esse indivíduo residia e trabalhava e com isso, poder definir a que outras micoses os trabalhadores desse local estavam expostos. Para tanto, foram realizadas coletas nessa Madeireira, uma em cada estação do ano. Diferentes amostras foram coletadas na Madeireira, incluindo: excretas de pombos e galinhas, serragem, pó de madeira, poeira, casca de eucalipto, folha de eucalipto e foi realizado o monitoramento do ar interno. Foram isoladas 180 leveduras, sendo 28 pertencentes ao Filo Basidiomycota e 115 pertencentes ao Filo Ascomycota. Para 37 leveduras, não foi possível chegar a uma espécie ou um gênero específico com os testes fenotípicos utilizados. Alguns estudos apontam o isolamento de um número maior de basidiomicetos em relação a ascomicetos. Nos estudos de Hong e colaboradores (2006), de 34 isolados, 26 foram identificados como basidiomicetos e 8 ascomicetos; Cafarchia *et al.* (2006) também identificaram mais espécies basidiomicéticas, diferente dos resultados do presente estudo, onde foram isoladas 3 vezes mais espécies de ascomicetos. Em relação aos sítios amostrais, obteve-se mais isolados de amostras do monitoramento do ar interno (76 leveduras - 42%), seguido por amostras de excretas (45 leveduras - 25%) e serragem (22 leveduras - 12%), já das amostras de pó de madeira (16 leveduras - 9%), poeira (10 leveduras - 6%), casca (8 leveduras - 4%) e folha de eucalipto (3 leveduras - 1%) foi obtido um número menor de isolados. Um maior isolamento do ar provavelmente se deve a dispersão das partículas leveduriformes pelo ambiente, o que ocorre naturalmente. Espécies de ambos os filos já foram descritas por habitar amostras semelhantes às coletadas em nosso estudo (POLIAKOVA *et al.*, 2001; SNIEGOWSKI *et al.*, 2002; PETER *et al.*, 2003; MIDDELHOVEN, 2004; NAKASE *et al.*, 2005; VADKERTIOVA & SLAVIKOVA, 2006). A influência do clima e das estações na prevalência de gêneros e espécies já foi estudada, mostrando que há uma prevalência de determinadas espécies em cada estação (CHAUDHURY *et al.*, 1996; GLUSHAKOVA & CHERNOV, 2004; DE ANA *et al.*, 2006). Nesse estudo as coletas foram realizadas uma em cada

estação do ano e obtivemos um maior número de isolados na primavera (62 leveduras - 34%), seguida pelo inverno (58 leveduras - 32%), verão (41 leveduras - 23%) e outono (19 leveduras - 11%). Na primavera há uma ampla variedade de substratos e o clima é favorável a inúmeras espécies leveduriformes. Nessa estação obtivemos a maior diversidade de gêneros e espécies, seguida pelo verão, onde foram isoladas diferentes espécies, conforme esperado. No inverno houve pouca diversidade, mas um grande número de isolados, diferentemente do outono, onde foram obtidos poucos isolados de apenas três gêneros diferentes. Os gêneros prevalentes em todas as estações são o *Cryptococcus*, *Pichia* e *Candida*, seguido pelo gênero *Debaryomyces* que foi amplamente isolado em todas as estações, exceto no outono.

Dos basidiomicetos, o gênero *Rhodotorula* foi o mais isolado nesse estudo. Esse gênero possui várias espécies envolvidas em micoses emergentes e é isolado de excretas de aves, plantas, frutas, água e outros (BOGUSLAWSKA-WAS & DABROWSKI, 2001; ZAAS *et al.*, 2003; COMBINA *et al.*, 2005; PASQUALOTTO *et al.*, 2005; CAFARCHIA *et al.*, 2006). A maioria dos isolados desse gênero são provenientes do monitoramento do ar e de amostras de excreta. O gênero *Cryptococcus* é frequentemente isolado de amostras de árvores e excretas de aves, e possui várias espécies emergentes, incluindo *C. laurentii*, com inúmeros relatos de caso clínico (SUGITA *et al.*, 2003; KHAWCHAROENPOM *et al.*, 2006). Os isolados desse gênero foram obtidos do monitoramento do ar, de excretas e pó de madeira não diferindo da literatura. Outros basidiomicetos isolados nesse estudo, porém em menor número de espécies incluem os gêneros *Kockovaella*, *Pseudozyma*, *Sporobolomyces* e *Trichosporon*. Desses, *Trichosporon* é um comprovado patógeno emergente, isolado do ar, de excretas de aves e de outros exemplares ambientais (SUGITA *et al.*, 2000; MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; SUGITA *et al.*, 2005; CAFARCHIA *et al.*, 2006). As espécies desse gênero foram mais comumente isoladas de excreta, concordando com outros estudos. Os demais gêneros são frequentemente encontrados em solos, poeira de casas e outros, concordando com os resultados obtidos nesse estudo (POLIAKOVA *et al.*, 2001; GLUHAKOVA *et al.*, 2004).

Dentre os isolados do filo Ascomycota, os gêneros prevalentes foram *Pichia*, *Candida* e *Debaryomyces*, respectivamente, tendo sido isolados de todos os sítios amostrais testados. Poucas espécies do gênero *Pichia* são consideradas emergentes (KRCMERY *et al.*, 1999; HOFMEYR & SLAVIN, 2006; OSTRONOFF *et al.*, 2006). São isoladas de diversos sítios, incluindo alimentos, solos, ar, água, entre outros. O gênero *Candida*, amplamente citado em infecções nosocomiais (RUIZ *et al.*, 2005; PAULA *et al.*, 2006), foi o segundo gênero mais isolado nesse estudo, seguido pelo gênero *Debaryomyces*. Ambos são amplamente distribuídos pelo ambiente, tendo sido isolados desde exemplares de água, alimentos até poeira no interior de ambientes domésticos (SOARES *et al.*, 1997; POLIAKOVA *et al.*, 2001; GLUSHAKOVA *et al.*, 2004; MOUNIER *et al.*, 2005; ANCASI *et al.*, 2006; LOPANDIC *et al.*, 2006; SENSES-ERGUL & OZBAS, 2006). O gênero *Debaryomyces* possui uma única espécie citada como emergente *Debaryomyces hansenii*, porém os artigos que citam essa espécie chamam a atenção para a espécie correspondente a sua fase anamórfica, *Candida famata* (WAGNER *et al.*, 2005). Outros ascomicetos isolados, porém com menor frequência, compreendem aos gêneros *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Williopsis* e *Zygozoma*. São comumente encontrados no solo, na água, em plantas, frutos, alimentos, entre outros (PRADA & PAGNOCCA, 1997; ROSA *et al.*, 1999; LACHANCE *et al.*, 2001; POLIAKOVA *et al.*, 2001; HONG *et al.*, 2002; MAKSIMOVA & CHERNOV, 2004; LOPANDIC *et al.*, 2006). No presente estudo foram isolados de vários sítios amostrais, concordando com a literatura. Os gêneros *Kodamaea*, *Hanseniaspora* e *Saccharomyces* possuem espécies patogênicas, com algumas descrições clínicas na literatura (GARCIA-MARTOS *et al.*, 1999; BELLET *et al.*, 2005; DE LLANOS *et al.*, 2006; TAJ-ALDEEN *et al.*, 2006; LEE *et al.* 2007). Algumas espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces* e *Zygozoma* são amplamente utilizadas pela indústria em processos fermentativos, na produção de toxinas, no processamento de produtos derivados do leite, na produção de enzimas e em biodegradação (KOENIG & DAY, 1989; RADLER *et al.*, 1990; NISHIMURA *et al.*, 2002; CAPECE *et al.*, 2005; LAITJILA *et al.*, 2006; LOPANDIC *et al.*, 2006; VALLES *et al.*, 2007).

Para confirmar a identificação fenotípica das espécies emergentes isoladas e para identificar as 37 linhagens, as quais não foi possível chegar a uma espécie ou um gênero específico com os testes fenotípicos utilizados, foi empregada a técnica de sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA, conforme descrito por Kurtzman & Robnett (1998). Essa região D1/D2 é altamente conservada e encontra-se seqüenciada em praticamente todas as espécies de leveduras conhecidas. Até o momento foram identificadas por essa técnica 27 leveduras, que estão dispostas na Tabela 4. Pelos testes fenotípicos utilizados foram isoladas as seguintes espécies emergentes: *Cryptococcus laurentii*, *C. luteolus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*, *Candida intermedia*, *C. sake-like*, *Debaryomyces hansenii*, *Kodamaea ohmeri* e *Pichia fabianii* (Tabela 3). Dessas, somente três linhagens foram identificadas pelo sequenciamento da região D1/D2 até o momento, que são: MA21a, Ep17b e 45b. A linhagem MA21a foi caracterizada como *Cryptococcus* sp. pelos testes fenotípicos, o que não se confirmou pela identificação molecular, que teve por resultado *Debaryomyces* sp.. Como resultou em um gênero na análise molecular, pode se tratar de uma possível espécie nova, isso justifica a dificuldade na identificação fenotípica. Para o isolado 45b a linhagem da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* descrita nas chaves de identificação utilizadas neste estudo, apresenta perfis de metabólicos diferentes do isolado 45b, o qual se enquadra aos perfis descritos para a espécie *Cryptococcus ater*, resultante da identificação bioquímica (BARNETT *et al.*, 2000). Já para a linhagem Ep17b, a identificação molecular validou a identificação fenotípica para a espécie *Rhodotorula mucilaginosa*. Das 37 linhagens sem identificação pelos métodos fenotípicos utilizados, 24 foram identificadas pelo sequenciamento da região D1/D2 até o presente momento (Tabela 4). Para essas espécies, foi realizada uma comparação entre o resultado obtido na identificação fenotípica e o perfil existente nas chaves de identificação utilizadas no estudo, utilizando como referência a identificação molecular. As linhagens MA27b (*Candida railenensis*), 50b (*Candida railenensis*), MA5d (*Candida pomicola*) e MA12d (*Candida pomicola*) apresentaram entre cinco e sete resultados diferentes entre os perfis bioquímicos e fisiológicos descritos para as linhagens das chaves de identificação. As demais linhagens identificadas também apresentaram

algumas diferenças, porém entre um ou três testes. Isso pode ser explicado pelo mecanismo de seleção ambiental e/ou pela existência de associações entre a levedura e seu substrato, gerando características bioquímicas e fisiológicas diferentes em uma mesma espécie (ROHM *et al.*, 1992; LOPANDICK *et al.*, 2006). Nesse estudo, a identificação fenotípica foi realizada com base em dados fornecidos pelo software YEASTCOMPARE (C. Ciriello & M.A. Lachance, Copyright © 1999 – 2001), que compara as características fenotípicas das leveduras com espécies conhecidas, aprimorando o trabalho de identificação. No caso dessas 24 linhagens, o programa não as incluiu na análise parcial, impossibilitando a correta identificação da espécie. O resultado da identificação molecular realizada até o momento, mostrou espécies dos gêneros mais descritos na identificação fenotípica, como *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, com exceção dos gêneros *Sporidiobolus* e *Rhodospidium*, que não foram identificados anteriormente nesse estudo. Algumas linhagens apresentaram-se somente como gêneros na identificação molecular (62b, 45c, MA28a, Ep1b, MA21a e MA68d), sendo possíveis candidatos a novas espécies. Estudos posteriores deverão ser realizados para confirmar e identificar as linhagens restantes utilizando o sequenciamento da região D1/D2 do rDNA.

Várias espécies de leveduras têm emergido como patógenos em potencial, causando preocupação na área de saúde pública. Tradicionalmente *Candida albicans* tem sido considerada a espécie de leveduras mais importante na causa de infecções nosocomiais, porém outras espécies têm emergido, incluindo espécies do gênero *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* entre outras (RUIZ *et al.*, 2005; PASQUALOTTO *et al.*, 2005; PAULA *et al.*, 2006). As micoses oportunistas, como o nome já diz, atingem indivíduos com deficiências no status imune, se aproveitando da falta de defesa para alojar-se e estabelecer doença. Porém, algumas espécies antes ditas oportunistas, atualmente apresentam quadros diferenciados, vindo a infectar indivíduos ditos “aparentemente imunocompetentes”. *Cryptococcus neoformans* é um exemplo dessa nova visão. Nesse estudo, espécies dos quatro gêneros mais isolados possuem relatos na literatura por causarem infecções fúngicas. Essas espécies possuem relatos por causarem micoses cutâneas, orais e sistêmicas, principalmente em indivíduos

imunocomprometidos (Tabela 3). Conhecendo esse perfil epidemiológico de leveduras emergentes e saprofíticas existentes na Madeireira, medidas profiláticas podem ser tomadas para evitar casos de micoses emergentes nos trabalhadores e freqüentadores desse local. Como sugerido no capítulo II, o uso de máscaras nasais evitaria a inalação contínua desses propágulos infectivos dispersos no ambiente. Para as leveduras com descrição de micoses cutâneas, é necessário evitar a exposição de feridas abertas, utilizando curativos. Uma higienização no interior da Madeireira também é importante para evitar a permanência de propágulos infectivos, não somente leveduras, mas também esporos de fungos filamentosos e bactérias. Esses propágulos podem ser carregados para o ambiente doméstico dos trabalhadores, vindo a ocasionar micoses em familiares. Com essas medidas pode-se evitar um grande número de doenças, como o caso descrito no capítulo I. Não podemos afirmar o local da infecção pela falta do isolado clínico de *C. neoformans*, porém o indivíduo residia e trabalhava nessa Madeireira e possivelmente contaminou-se nesse local.

6 CONCLUSÕES

Com o estudo realizado podemos concluir:

- A importância do estudo acerca das espécies leveduriformes nesse local deve-se ao caso clínico relatado no capítulo I e ao número crescente de micoses emergentes.
- Das 180 leveduras isoladas no estudo, 143 foram identificadas no mínimo ao nível de gênero com os testes fenotípicos, mostrando um bom aproveitamento dos métodos utilizados. Dessas, 28 são pertencentes ao Filo Basidiomycota e 115 pertencentes ao Filo Ascomycota.
- Foi verificada uma variação sazonal dos gêneros isolados em cada coleta. Os gêneros prevalentes foram: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Pichia*. Espécies desses gêneros foram isoladas em todas as estações do ano.
- O ambiente da Madeireira é propício para o estabelecimento de leveduras pelos substratos de madeira existentes. O perfil leveduriforme desse ambiente apresenta espécies patogênicas e saprofitas. Algumas espécies isoladas e identificadas no estudo possuem relatos de envolvimento em micoses oportunistas. Porém a maioria dos isolados são ambientais e até o momento não possuem relato clínico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectivas para futuros estudos, podemos citar:

- Continuar a utilizar o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA para confirmar a identificação fenotípica das espécies com caso clínico descrito na literatura e para identificar as leveduras que não puderam ser identificadas pelos métodos tradicionais.

REFERÊNCIAS

ALTAMURA, M.; CASALE, D.; PEPE, M.; TAFARO, A. Immune Responses to Fungal Infections and Therapeutic Implications. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**, v. 1, p. 189 – 197, 2001.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, p. 403 - 410, 1990.

ANCASI, E.G.; CARRILLO, L.; BENITEZ AHRENDTS, M.R. Moulds and yeasts in bottled water and soft drinks. **Rev Argent Microbiol**, v. 38, p. 93 – 96, 2006.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts, Characteristics and Identification**. 4th edition, Cambridge University Press, Cambridge, 2000, 811p.

BASSETTI, M.; RIGUI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M.P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F.B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 6 – 21, 2006.

BEECH, F.W.; CARR, J.G.; CODNER, R.C. A multipoint inoculator for plating bacteria or yeasts. **J Gen Microbiol**, v. 13, p. 408 – 410, 1955.

BELET, N.; DALGIC, N.; ONCEL, S.; CIFTCI, E.; INCE, E.; GURIZ, H.; BARLAS, M.; DOGRU, U. Catheter-related fungemia caused by *Saccharomyces cerevisiae* in a newborn. **Pediatr Infect Dis J**, v. 24, p. 1125, 2005.

BOGUSLAWSKA-WAS, E & DABROWSKI, W. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. **Int J Hyg Environ Health**, v. 203, p. 451 – 458, 2001.

CAFARCHIA, C.; CAMARDA, A.; ROMITO, D.; CAMPOLO, M.; QUAGLIA, N.C.; TULLIO, D. OTRANTO, D. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. **Mycophatologia**, v. 161, p. 229 – 234, 2006.

CAPECE, A.; FIORE, C.; MARAZ, A.; ROMANO, P. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. **J Appl Microbiol**, v. 98, p. 136 – 144, 2005.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biol Rev**, v. 73, p. 203 – 266, 1998.

CHAUDHURY, A.; NATH, G.; SHUKLA, B.; PANDA, S.; SINGH, B. Diarrhoea associated with *Candida* spp.: incidence and seasonal variation. **J Diarrhoea Dis Res**, v. 14, p. 110 – 112, 1996.

COMBINA, M.; MERCADO, L.; BORGIO, P.; ELIA, A.; JOFRE, V.; GANGA, A.; MARTINEZ, C.; CATANIA, C. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. **J Appl Microbiol**, v. 98, p. 1055 – 1061, 2005.

DE ANA, S.G.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M.; RAMIREZ, E.A.; GARCIA, S.M.; BELMONTE-SOLER, J. Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 16, p. 357-63, 2006.

DE LLANOS, R.; QUEROL, A.; PEMAN, J.; GOBERNADO, M.; FERNANDEZ-ESPINAR, M.T. Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. **Int J Food Microbiol**, v. 110, p. 286 – 290, 2006.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 50, p. 1351 – 1371, 2000.

FUENTEFRÍA, A.M. Identificação e Avaliação do Potencial Biotecnológico de Leveduras e Fungos Semelhantes a Leveduras Isolados de Filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

GARCIA-MARTOS, P.; HERNANDEZ-MOLINA, J.M.; GALAN, F.; RUIZ-HENESTROSA, J.R.; GARCIA-AGUDO, R.; PALOMO, M.J. MIRA, J. Isolation of *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) in humans. **Mycophatologia**, v. 144, p. 73 – 75, 1999.

GIL, L.G.; FOSTER, B.C.; NEIRA, Q.O.; PALMA, C.S.; BASUALDO, A.J.; HEREDIA, P.C.; FERNANDEZ, V.A.; JULIET, L.C.; TAPIA, A.J.C. *Cryptococcus neoformans* arthritis in elderly adult: Case report and review. **Rev Chilena Infectol**, v. 23, p. 330 – 335, 2006.

GLUSHAKOVA, A.M. & CHERNOV, I.I.U. Seasonal dynamics in a yeast population on the *Oxalis acetosella* L. leaves. **Mikrobiologija**, v. 73, p. 226 – 232, 2004.

GLUSHAKOVA, A.M.; ZHELTIKOVA, T.M.; CHERNOV, I.I.U. Groups and sources of yeasts in house dust. **Mikrobiologija**, v. 73, p. 111 – 117, 2004.

HOFMEYR, A. & SLAVIN, M.A. Emerging opportunistic yeast infections in hematology patients. **Leuk Lymphoma**, v. 47, p. 1736 – 1737, 2006.

HONG, S.G.; LEE, K.H.; BAE, K.S. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. **J Microbiol**, v. 40, p. 55 – 62, 2002.

HONG, S.G.; LEE, K.H.; KWAK, J.; BAE, K.S. Diversity of Yeasts Associated with *Panax ginseng*. **J Microbiol**, v. 44, p. 674 – 679, 2006.

KAM, A.P. & XU, J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 43, p. 19 – 28, 2002.

KHAWCHAROENPOM, T.; APISAMTHANARAK, A.; KIRATISIN, P.; MUNDY, L.M.; MAILEY, T.C. Evaluation of *Cryptococcus laurentii* meningitis in a patient with HIV infection: a case report and review of the literature. **Hawaii Med J**, v. 65, p. 260 – 263, 2006.

KIKEN, D.A.; SEKARAN, A.; ANTAYA, R.J.; DAVIS, A.; IMAEDA, S.; SILVERBERG, N.B. White piedra in children. **J Am Acad Dermatol**, v. 55, p. 956 – 961, 2006.

KOENIG, D. & DAY, D. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. **Eur J Biochem**, v. 183, p. 161 – 167, 1989.

KOYANAGI, T.; NISHIDA, N.; OSABE, S.; IMAMURA, Y.; YAMAMOTO, S.; SHICHIJI, A.; NAKAMURA, Y. Autopsy case of disseminated *Trichosporon inkin* infection identified with molecular biological and biochemical methods. **Pathol Int**, v. 56, p. 738 – 743, 2006.

KRCMERY, V.; KRUPOVA, I.; DENNING, D.W. Invasive yeast other than *Candida* spp. in acute leukemia. **J Hosp Infect**, v. 41, p. 181 – 194, 1999.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984, 1028p.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J. **The yeasts, a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. 1088 p.

KURTZMAN, C.P. & ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331–371, 1998.

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T.; ROSA, C.A.; BOWLES, J.M.; BARKER, J.S.; JANZEN, D.H. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Res**, v. 1, p. 1 – 8, 2001.

LAITJILA, A.; WILHELMSON, A.; KOTAVIITA, E.; OLKKU, J.; HOME, S.; JUVONEN, R. Yeasts in an industrial malting ecosystem. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 953 – 966, 2006.

LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E.M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **J Bacteriol**, v. 63, p. 399 – 406, 1952.

LEE, J.S.; SHIN, J.H.; KIM, M.N.; JUNG, S.I.; PARK, K.H.; CHO, D.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. *Kodamaea ohmeri* in a University Hospital: Identification, Antifungal, Susceptibility and PFGE analysis. **J Clin Microbiol**, v. ?, 2007.

LOPANDIC, K.; ZELGER, S.; BANSZKY, L.K.; ELISKASES-LECHNER, F.; PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiol**, v. 23, p. 341 – 350, 2006.

LUI, G.; LEE, N.; IP, M.; CHOI, K.W.; TSO, Y.K.; LAM, E.; CHAU, S.; LAI, R.; COCHRAN, C.S. Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients. **Q J Med**, v. 99, p. 143 – 151, 2006.

LUZZATI, R.; ALLEGRANZI, B.; ANTOZZI, L.; MASALA, L.; PEGORARO, E.; AZZINI, A.; CONCIA, E. Secular trends in nosocomial candidaemia in non-neutropenic patients in an Italian tertiary hospital. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, p. 908 – 913, 2005.

MAKSIMOVA, I.A. & CHERNOV, I.I.U. Community structure of yeast fungi in forest biogeocenoses. **Mikrobiologija**, v. 73, p. 558 – 566, 2004.

MIDDELHOVEN, W.J. The yeast flora of some decaying mushrooms on trunks of living trees. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 49, p. 569 – 573, 2004.

MLINARIC-MISSONI, E.; KALENIC, S.; VAZIC-BABIC, V. Species distribution and frequency of isolation of yeasts and dermatophytes from toe webs of diabetic patients. **Acta Dermatovenerol Croat**, v. 13, p. 85 – 92, 2005.

MOHL, W.; LERCH, M.M.; KLOTZ, M.; FREIDANK, H.; ZEITZ, M. Infection of an intravenous port system with *Metschnikowia pulcherrima* Pitt et Miller. **Mycoses**, v. 41, p. 425 – 426, 1998.

MOUNIER, J.; GELSOMINO, R.; GOERGES, S.; VANCANNEYT, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; SCHERER S.; SWINGS, J.; FITZGERALD, G.F.; COGAN, T.M. Surface Microflora of Four Smear-Ripened Cheeses. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 6489 – 6500, 2005.

NAKASE, T.; TSUZUKI, S.; LEE, F.L.; JINDAMORAKOT, S.; JAN-NGAM, H.; AM-IN, S.; POTACHAROEN, W.; TANTICHAROEN, M.; TAKASHIMA, M. *Sporobolomyces diospyroris* sp. nov., *Sporobolomyces lophatheri* sp. nov. and *Sporobolomyces pyrrosiae* sp. nov., three new species of ballistoconidium-forming yeasts in the *Agaricostilbum lineage* isolated from plants in Taiwan. **J Gen Appl Microbiol**, v. 51, p. 277 – 286, 2005.

NEUFELD, P.M. **Manual de Micologia médica**: técnicas básicas de diagnóstico. Programa Nacional de Controle de Qualidade, Rio de Janeiro, 1999. 240 p.

NISHIMURA, K.; YAMAMOTO, M.; NAKAGOMI, T.; TAKIGUCHI, Y.; NAGANUMA, T.; UZUKA, Y. Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces starkeyi*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 58, p. 848 – 852, 2002.

OSTRONOFF, F.; OSTRONOFF, M.; CALIXTO, R.; DOMINGUES, M.C.; SOUTO MAIOR, A.P.; SUCUPIRA, A.; FLORÊNCIO, R.; TAGLIARI, C. *Pichia ohmeri* fungemia in a hematologic patient: An emerging human pathogen. **Leukemia & Lymphoma**, v. 47, p. 1949 – 1951, 2006.

PASQUALOTTO, A.C.; SUKIENNIK, T.C.; SEVERO, L.C.; AMORIM, C.S.; COLOMBO, A.L. An outbreak of *Pichia anomala* fungemia in a Brazilian pediatric intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 26, p. 553 – 558, 2005.

PASQUALOTTO, G.C.; COPETTI, F.A.; MENESES, C.F.; MACHADO, A.R.; BRUNETTO, A.L. Infection by *Rhodotorula* sp. in children receiving treatment for malignant diseases. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 27, p. 232 – 233, 2005.

PASSONI, L.F.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environmental of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med Mycol**, v. 36, p. 305 – 311, 1998.

PAULA, C.R.; KREBS, V.L.; AULER, M.E.; RUIZ, L.S.; MATSUMOTO, F.E.; SILVA, E.H.; DINIZ, E.M.; VAZ, F.A. Nosocomial infection in newborns by *Pichia anomala* in a Brazilian intensive care unit. **Med Mycol**, v. 44, p. 479 – 484, 2006.

PETER, G.; TORNAI-LEHOCZKI, J.; FULOP, L.; DLAUCHY, D. Six new methanol assimilating yeast species from wood material. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 84, p. 147 – 159, 2003.

PFALLER, M.A.; PRESTON, T.; BALE, M.; KOONTZ, F.P.; BODY, B.A. Comparison of the Quantum II, API Yeast Ident, and AutoMicrobic systems for identification of clinical yeast isolates. **J Clin Microbiol**, v. 26, p. 2054 – 2058, 1988.

POLIAKOVA, A.V.; CHERNOV, I.I.U.; PANIKOV, N.S. Yeast biodiversity in hydromorphic soils with reference to grass-Sphagnum swamp in Western Siberia and the hammocky tundra region (Barrow, Alaska). **Mikrobiologija**, v. 70, p. 714 – 720, 2001.

PRADA, G.M. & PAGNOCCA, F.C. Ascomycetous yeasts associated with naturally occurring fruits in a tropical rain forest. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 42, p. 39 – 46, 1997.

RADLER, F.; SCHMITT, M.J.; MEYER, B. Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. **Arch Microbiol**, v. 154, p. 175 – 178, 1990.

RAMOS, J.P.; VALENTE, P.; DE SOUZA, R.A.; ROSA, C.A.; LEONCINI, O. Heteroduplex mobility assay of the D1/D2 region of the 26S rDNA for differentiation of *Saccharomyces* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 206 – 210, 2001.

ROHM, H.; ELISKASES-LECHNER, F.; BRÄUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **J Appl Bacteriol**, v. 72, p. 370 – 376, 1992.

ROSA, C.S.; LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T; BOWLES, J.M; SCHLAG-EDLER, B. *Kodamaea nitidulidarum*, *Candida restingae* and *Kodamaea anthophila*, tree new related yeast species from ephemeral flowers. **Int J Syst Bacteriol**, v. 49, p. 309 – 318, 1999.

RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M.F.; MONTELLI, A.C.; MATSUMOTO, F.E.; PIRES, M.F.C.; DA SILVA, B.C.M.; SILVA, E.H.; GANDRA, R.F.; GONCALVES DA SILVA, E.; AULER, M.E.; PAULA, C.R. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **J Mycol Med**, v. 15, p.13 – 21, 2005.

SENSES-ERGUL, S. & OZBAS, Z.Y. Characterization of the yeast flora present in some Turkish high-sugar products. **J Gen Appl Microbiol**, v. 52, p. 99 – 106, 2006.

SHIFRINE, M.; PHAFF, H.J. DEMAIN, A.L. Determination of carbon assimilation patterns of yeasts by replica plating. **J Bacteriol**, v. 68, p. 28 – 35, 1954.

SNIEGOWSKI, P.D.; DOMBROWSKI, P.G.; FINGERMAN, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. **FEMS Yeast Res**, v. 1, p. 299 – 306, 2002.

SANTOS, A.; MARQUINA, D. BARROSO, J.; PEINADO, J.M. (1-6)-Beta-D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. **Lett Appl Microbiol**, v. 34, p. 95 – 99, 2002.

SOARES, C.A.G.; MAURY, M.; PAGNOCCA, F.C.; ARAUJO, F.V.; MENDONÇA-HAGLER, L.; HAGLER, A.N. Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries. **J Gen Appl Microbiol**, v. 43, p. 265 – 272, 1997.

STADEN, R.; BEAL, K.F.; BONFIELD, J.K. The Staden package. **Methods Mol Biol**, v. 132, p. 115 – 130, 2000.

SUGITA, T.; KIKUCHI, K.; MAKIMURA, K.; URATA, K.; SOMEYA, T.; KAMEI, K.; NIIMI, M.; UEHARA, Y. *Trichosporon* Species Isolated from Guano Samples Obtained from Bat-Inhabited Caves in Japan. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 7626 – 7629, 2005.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; ICHIKAWA, T.; IKEDA, R.; SHINODA, T. Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental materials. **Med Mycol**, v. 38, p. 27 – 30, 2000.

SUGITA, T.; SAITO, M.; ITO, T.; KATO, Y.; TSUBOI, R.; TAKEUCHI, S.; NISHIKAWA, A. The basidiomycetous yeasts *Cryptococcus diffluens* and *C. liquefaciens* colonize the skin of patients with atopic dermatitis. **Microbiol Immunol**, v. 47, p. 945 – 950, 2003.

TAJ-ALDEEN, S.J.; DOIPHODE, S.H.; HAN, X.Y. *Kodamaea (Pichia) ohmeri* fungaemia in a premature neonate. **J Med Microbiol**, v. 55, p. 237 – 239, 2006.

THANOS, L.; MYLONA, S.; KOKKINAKI, A.; POMONI, M.; TSIOURIS, S.; BATAKIS, N. Multifocal skeletal tuberculosis with *Rhodotorula minuta* co-infection. **Scand J Infect Dis**, v. 38, p. 309 – 311, 2006.

VADKERTIOVA, R. & SLAVIKOVA, E. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environmental. **J Basic Microbiol**, v. 46, p. 145 – 152, 2006.

VALLES, B.S.; BEDRINANA, R.P.; TASCÓN N.F.; SIMÓN, A.Q.; MADRERA, R.R. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. **Food Microbiol**, v. 24, p. 25 – 31, 2007.

WAGNER, D.; SANDER, A.; BERTZ, H.; FINKER, J.; KERN, W.V. Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin B and caspofungin for suspected aspergillosis. **Infection**, v. 33, p. 397 – 400, 2005.

WOJCIK-STOPCZYŃSKA, B.; FALKOWSKI, J.; JAKUBOWSKA, B. Air microflora of university cafeteria. **Rocz Panstw Zakl Hig**, v. 54, p. 321 – 328, 2003.

WONG, A.R.; IBRAHIM, H.; VAN ROSTENBERGUE, H.; ISHAK, Z.; RADZI, M.J. *Hansenula anomala* infection in a neonate. **J Pediatr Child Health**, v. 36, p. 609 – 610, 2000.

XU, J.; BOYD, C.M.; LIVINGSTON, E.; MEYER, W.; MADDEN, J.F.; MITCHELL, T.G. Species and Genotypic Diversities and Similarities of Pathogenic Yeasts Colonizing Women. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 3835 – 3843, 1999.

YAPAR, N.; UYSAL, U.; YUCESÖY, M.; ÇAKIR, N.; YUCE, A. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital. **Mycoses**, v. 49, p. 134 – 138, 2006.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: **The Yeasts. A Taxonomic Study**, Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. Amsterdam, Elsevier Science, p. 77 – 100, 1998.

ZAAS, A.K.; BOYCE, M.; SCHELL, W.; LODGE, B.A.; MILLER, J.L.; PERFECT, J.R. Risk of Fungemia Due to *Rhodotorula* and Antifungal Susceptibility Testing of *Rhodotorula* Isolates. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 5233 – 5235, 2003.

APÊNDICES

Apêndice 1. Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

Leveduras	cepa	Coloração da colônia	Brilho da colônia	Superfície da colônia	Consistência da colônia	Forma da célula	Tamanho da célula	Esporos sexuais	Formação de micélio
Basidiomicetos									
<i>Cryptococcus ater</i>	45b	salmão	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Ep11c	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
<i>Cryptococcus luteolus</i> - ?	MA27c	bege	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
<i>Cryptococcus luteolus</i>	56e	salmão	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
<i>Cryptococcus</i> sp.	MA5a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	bacilar	grande	ausente	ausente
	MA21a	branca	opaca	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Cryptococcus</i> sp.	MA62g	pêssego	opaca	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	Ep8d	salmão	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	36a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Kockovaella thailandica</i>	MA27a	creme	opaca	rugosa	seca	redonda	média	ausente	ausente
<i>Rhodotorula futronensis</i>	62a	pêssego	opaca	lisa	cremosa	bacilar	grande	ausente	ausente
<i>Rhodotorula marina</i>	Ep13a	laranja	brilhosa	lisa	mucóide	bacilar	grande	ausente	ausente
<i>Rhodotorula minuta</i>	MA45d	salmão	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MA42c	laranja	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
	MA68b	salmão	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
	MA69a	vermelha	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
	E15a	salmão	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
	Ep17b	laranja	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
	55a	salmão	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
<i>Rhodotorula</i> sp.	MA64c	laranja	brilhosa	lisa	mucóide	bacilar	média	ausente	ausente
	MA65d	salmão	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
<i>Pseudozyma rugulosa</i>	MA45c	salmão	opaca	rugosa	cremosa	bacilar	grande	ausente	ausente
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Ep4d	vermelha	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Sporobolomyces sp.</i>	MA67b	vermelha	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ausente	ausente
<i>Trichosporon asahii</i>	E15d	amarela	opaca	rugosa	esfarelada	bacilar	média	ausente	ausente
<i>Trichosporon sp.</i>	MA43a	amarelo	opaca	rugosa	seca	bacilar	média	ausente	ausente
<i>Trichosporon sp.</i>	E15e	amarelo	opaca	rugosa	seca	oval	média	ausente	ausente
	Ep17c	creme	opaca	rugosa	seca	redonda	grande	ausente	ausente
Ascomicetos									
<i>Candida aurangiensis</i>	38b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	pequena	ausente	ausente
<i>Candida intermedia</i>	MA26a	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	Ep6a	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
<i>Candida ontarioensis</i>	MA12c	branca	opaca	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Candida litsaeae</i>	MA23d	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ausente	ausente
	Ep6b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	6b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	20c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	21d	branca	opaca	lisa	cremosa	oval	grande	ausente	ausente
<i>Candida sake</i> - ?	33e	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ausente	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Candida silvanorum</i> - ?	MA30b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	media	ausente	ausente
<i>Candida sorbophila</i>	E14a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	pequena	ausente	ausente
<i>Candida</i> sp.	MA24a	creme	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	MA43b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	MA46c	bege	brilhosa	lisa	mucóide	oval	pequena	ausente	ausente
	MA49a	creme	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	MA50a	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	pequena	ausente	ausente
	MA50b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	MA62e	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	pequena	ausente	ausente
	MA67c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	MA68a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	Ep13c	branca	opaca	rugosa	seca	oval	média	ausente	pseudohifa
	18a	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ausente	ausente
	41b	branca	brilhosa	lisa	mucóide	oval	pequena	ausente	ausente
	44b	branca	brilhosa	lisa	mucóide	oval	pequena	ausente	ausente
	46a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	54a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	pequena	ausente	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Candida</i> sp.	54b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	54c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	56b	branca	brilhosa	lisa	mucóide	redonda	média	ausente	ausente
	57a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
	58a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
<i>Debaryomyces hanssenii</i> var. <i>fabryi</i>	MA44a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA46a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA68c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	Ep1a	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	Ep8c	creme	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	Ep13b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	51a	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
<i>Debaryomyces hanssenii</i> var. <i>hanssenii</i>	MA41c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA42e	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	Ep3a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	Ep5b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Debaryomyces yamadae</i>	MA41a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	MA49b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	44a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
<i>Debaryomyces maramus</i>	Ep1d	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	Ep4c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
<i>Debaryomyces castelli</i>	39a	branca	opaca	rugosa	seca	bacilar	grande	ausente	ausente
<i>Debaryomyces robertisiae</i>	MA23b	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
<i>Debaryomyces sp.</i>	MA23a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA23c	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA45a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA48a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA65b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	Ep7c	branca	opaca	rugosa	esfarelada	bacilar	média	ausente	pseudohifa
	Ep8a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	pequena	ascósporos	ausente
	Ep9a	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	Ep9c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	36b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	48b	bege	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	50a	bege	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
<i>Hanseniaspora</i> sp.	MA47b	bege	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
<i>Kluyveromyces lactis</i>	MA44c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	MA65f	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	45a	branca	opaca	rugosa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Ep11d	branca	opaca	rugosa	esfarelada	oval	grande	ascósporos	pseudohifa
	Ep17a	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ascósporos	pseudohifa
<i>Lipomyces starkeyi</i>	37a	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
<i>Lipomyces</i> sp.	51b	branca	opaca	rugosa	seca	redonda	média	ascósporos	ausente
<i>Pichia scolyty</i>	MA12e	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	MA24b	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	MA42b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	MA64b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	E9a	branca	opaca	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	Ep7a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	Ep8b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ascósporos	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Pichia scolyty</i>	Ep9b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	Ep10a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	Ep11a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	38a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	48a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	48d	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
<i>Pichia scolyty</i> - ?	Ep5a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
<i>Pichia acaciae</i>	39b	branca	opaca	rugosa	seca	oval	grande	ascósporos	ausente
<i>Pichia fabianii</i>	MA70a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
<i>Pichia jadinii</i>	MA62f	branca	brilhosa	lisa	cremosa	bacilar	grande	ascósporos	ausente
<i>Pichia nakazawae</i>	MA45b	branca	brilhosa	rugosa	cremosa	bacilar	grande	ascósporos	ausente
<i>Pichia philogaea</i>	33a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
<i>Pichia subpelliculosa</i>	Ep11b	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	43c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	48c	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
<i>Pichia sydowiorum</i>	40a	bege	opaca	lisa	cremosa	oval	médio	ascósporos	ausente
<i>Pichia xylosa</i>	56d	bege	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Pichia</i> sp.	MA41b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	MA42a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	MA46b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	MA44d	bege	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA49d	bege	opaca	lisa	seca	oval	média	ascósporos	pseudohifa
	MA61a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	MA62d	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
	MA70b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	Ep4a	bege	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ascósporos	ausente
	Ep7a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	pequena	ascósporos	ausente
	41a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	48e	branca	opaca	lisa	cremosa	oval	grande	ascósporos	ausente
	55b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	56b	bege	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ascósporos	ausente
	56c	bege	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ascósporos	ausente
	58b	bege	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ascósporos	ausente
<i>Torulaspota pretoriensis</i>	Ep17d	bege	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

<i>Saccharomyces sp.</i>	E15b	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ascósporos	ausente
	E12a	creme	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ascósporos	ausente
<i>Williopsis californica</i>	Ep15b	bege	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ascósporos	ausente
<i>Zygozoma sp.</i>	MA47a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ascósporos	ausente
Não identificadas									
	MA4a	branca	brilhosa	lisa	mucóide	oval	pequena	ausente	ausente
	MA5d	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	MA12d	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
	MA27b	creme	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	pseudohifa
	MA28a	bege	opaca	rugosa	seca	oval	grande	ausente	ausente
	MA28b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ausente	ausente
	MA30a	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ausente	ausente
	MA30c	creme	opaca	rugosa	seca	oval	grande	ausente	pseudohifa
	MA42d	branca	opaca	rugosa	esfarelada	oval	média	ausente	pseudohifa
	MA44b	salmão	brilhosa	lisa	cremosa	bacilar	pequena	ausente	ausente
	MA48b	salmão	brilhosa	rugosa	cremosa	bacilar	grande	ausente	ausente
	MA49c	vermelho	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
	MA50c	salmão	brilhosa	lisa	cremosa	bacilar	média	ausente	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

MA65a	degradê	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	pequena	ausente	ausente
MA65c	creme	brilhosa	lisa	cremosa	bacilar	média	ausente	pseudohifa
MA65e	amarela	brilhosa	lisa	mucóide	redonda	pequena	ausente	ausente
MA68d	amarela	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	grande	ausente	ausente
E15c	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	grande	ausente	ausente
Ep1b	branca	opaca	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
Ep1c	salmão	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
Ep4b	rosa claro	brilhosa	lisa	cremosa	bacilar	grande	ausente	ausente
Ep8e	bege	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
6d	branca	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
6e	branca	opaca	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
18b	rosa	brilhosa	lisa	mucóide	oval	grande	ausente	ausente
19d	branca	opaca	rugosa	seca	redonda	média	ausente	pseudohifas
20a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
21e	branca	brilhosa	lisa	mucóide	oval	média	ausente	ausente
27a	branca	opaca	lisa	cremosa	oval	grande	ausente	ausente
30a	rosa	opaca	lisa	cremosa	redonda	grande	ausente	ausente

Apêndice 1. Continuação - Características morfológicas das leveduras isoladas neste estudo

33c	laranja	brilhosa	lisa	cremosa	bacilar	grande	ausente	ausente
33d	branca	brilhosa	rugosa	cremosa	redonda	grande	ausente	ausente
43a	branca	brilhosa	lisa	cremosa	oval	média	ausente	ausente
43b	branca	brilhosa	lisa	mucóide	oval	pequena	ausente	ausente
45c	amarela	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	ausente
50b	branca	brilhosa	lisa	cremosa	redonda	média	ausente	pseudohifa
62b	preta	opaca	rugosa	cremosa	bacilar	média	ausente	pseudohifa

Apêndice 2. Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

Leveduras	Cepa	Fermentações			Assimilação Fontes C.							Assimilação Fontes N.										
		D-glicose	D-galactose	Maltose	D-glicose	D-galactose	D-xilose	D-arabinose	Maltose	Trealose	Amido	D-manitol	Celbiose	Lactose	Rafinose	M-inositol	N-acetilglicosamina	Nitrato	Nitrito	L-lisina	Etilamina	Tryptofano
Basidiomicetos																						
<i>Cryptococcus ater</i>	45b	-	-	-	+	-	-	+	+		+	+	+	+	+	+	W	-	-	W	-	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Ep11c	-	-	-	+	+	+			+	+		+	+	+	+	-	-	-	+	-	
<i>Cryptococcus luteolus</i> - ?	MA27c	+	-	-	-	+	+			+	W		+	+	+	+	+	+	-	W	-	
<i>Cryptococcus luteolus</i>	56e	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+		+	+	-	-	-	-	+	+	
<i>Cryptococcus</i> sp.	MA5a	-	-	-	+	+	+			+	-		+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	MA21a	-	-	-	+	+	+			+	+		+	+	+	+	+	W	-	+	-	
	MA62g	-	-	-	+	+	+	-	W	+	-	-	-	-	W	-	-	+	-	+	-	
	Ep8d	-	-	-	+	+	+			W			-	+	+	-	-	-	-	-	+	
	36a	+	+	-	+	+	+			+			+	+	+	+	-	+	-	+	W	
<i>Kockovaella thailandica</i>	MA27a	+	-	-	+	+	+			+	+		+	+	+	-	+	-	-	+	-	

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

<i>Rhodotorula futronensis</i>	62a	-	-	-	+	+	+	W	-	-	+	W	W	-	-	-	-	+		
<i>Rhodotorula marina</i>	Ep13a	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	W	-	
<i>Rhodotorula minuta</i>	MA45d	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	W	-	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MA42c	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
	MA68b	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	
	MA69a	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
	E15a	-	-	-	+	+	+	-	+	W	+	+	+	+	W	W	+	-	W	-
	Ep17b	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	W	-	-	+	-	
	55a	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
<i>Rhodotorula sp.</i>	MA64c	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	
	MA65d	-	-	-	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	-	-	+	-	
<i>Pseudozyma rugulosa</i>	MA45c	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Ep4d	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	W	+	-	+	-	+	-	W	
<i>Sporobolomyces sp.</i>	MA67b	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	
<i>Trichosporon asahii</i>	E15d	-	-	-	+	+	W	+	W	-	+	W	+	W	-	+	-	-	W	
<i>Trichosporon sp.</i>	MA43a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
	E15e	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

<i>Trichosporon</i> sp.	Ep17c	-	-	-	+	+	-	+	W	W	+	+	+	-	+	-	-	+		
Ascomicetos																				
<i>Candida aurangiensis</i>	38b	+	+	-	+	+	+			+	+	W	+	+	-	+	+	-	+	W
<i>Candida intermedia</i>	MA26a	+	-	-	+	+	+			+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	W
	Ep6a	+	-	-	+	+	+			+	W	+	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>Candida ontarioensis</i>	MA12c	+	-	-	+	+	+			+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Candida litsaeae</i>	MA23d	+	-	-	+	+	+			+	W	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	Ep6b	+	+	-	+	+	+			+	W	+	+	+	W	+	-	-	+	-
	6b	+	+	-	+	+	+			+	W	+	W	+	-	W	+	-	+	W
	20c	+	+	-	+	+	+			+	+	+	+	+	-	W	+	-	+	+
	21d	+	+	-	+	+	+			+	W	+	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>Candida sake</i> - ?	33e	+	-	-	+	+	W			+	W	+	W	-	-	+	W	-	+	-
<i>Candida silvanorum</i> - ?	MA30b	+	+	-	+	+	+			+	+	+	+	+	-	W	+	-	+	W
<i>Candida sorbophila</i>	E14a	-	-	-	+	+	+	W	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Candida</i> sp.	MA24a	+	-	-	+	+	+			+	-	+	+	+	W	+	-	-	+	-

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

<i>Candida</i> sp.	MA43b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	-	-	+	-	+	-
	MA46c	+	-	+	+	+	+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	MA49a	-	-	-	+	+	+	+	+		-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	MA50a	+	-	-	+	+	+	+	+		-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	MA50b	+	+	-	+	+	+	W	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	MA62e	+	-	-	+	+	+	W	+		+	+		+	+	-	-	+	-	+	-	-
	MA67c	+	+	-	+	+	+	+	+		+	+		+	+	-	-	+	-	+	-	-
	MA68a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	W
	Ep13c	+	-	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	18a	+	+	-	+	+	+			+	+		+	+	+	+	+	W	+	-	+	-
	41b	+	-	+	+	+	+			+	+			W	W	-	+	+	-	+	+	+
	44b	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	W	W	+	-	+	+	-	+	-	-
	46a	+	+	-	+	+	+			+	+		+	+	+	-	-	+	W	+	-	-
	54a	+	+	-	+	+	+	+	+		-	+		+	+	-	-	+	-	+	+	+
	54b	+	-	-	+		-	+		+	W		W			+		+	-	+	-	-
	54c	+	+	-	+	+	+	+	+		W	+		+	+	-	W	+	-	+	-	-
	56b	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	W	+		+	-	+	+

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

<i>Candida</i> sp.	57a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
	58a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	W	+	-	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	MA44a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
	MA46a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	W	+	+	-	+	-	+	-	-
	MA68c	-	-	-	+	+	+	W	+	+	W	+	+	+	+	-	-	-	-
	Ep1a	-	-	-	+	+	+		+	W		+	+	+	-	+	-	-	+
	Ep8c	-	-	-	+	+	+		+	W		+	+	+	-	+	-	-	+
	Ep13b	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	-	+	-	-	+
	51a	-	-	-	+	+	+		+	+	-	+	+	W	+	-	+	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	MA41c	+	-	-	+	+	+		+	W		+	+	+	-	+	-	-	+
	MA42e	+	-	-	+	+	+	-	+		W	+	+	+	+	-	+	-	-
	Ep3a	+	-	-	+	+	+		+	+		+	+	+	W	+	-	-	+
	Ep5b	-	-	-	+	+	+		+			W	+	+	-	W	-	-	+
<i>Debaryomyces yamadae</i>	MA41a	+	+	-	+	+	+	-	+		-	+	+	+	+	-	+	-	-
	MA49b	+	+	-	+	+	+	-	+		-	+	+	-	+	-	+	-	-
	44a	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

<i>Debaryomyces maramus</i>	Ep1d	-	-	-	+	+	+	+	W	+	+	+	W	+	-	-	W	-		
	Ep4c	-	-	-	+	W	+	+		+	+	+	W	+	-	-	+	-		
<i>Debaryomyces castelli</i>	39a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	W		
<i>Debaryomyces robertisiae</i>	MA23b	+	-	-	+	+	+	+	+	+	W	+	-	+	-	-	+	-		
<i>Debaryomyces</i> sp.	MA23a	+	-	-	+	+	+	+	+	+	W	+	-	+	-	-	+	-		
	MA23c	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-		
	MA45a	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	W	+	-	+	-	-	+	-
	MA48a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
	MA65b	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	W	-	
	Ep7c	-	+	-	+	+	+	+	+	W	+	+	-	+	-	-	W	-		
	Ep8a	-	-	-	+	+	+	+		+	+	+	-	+	-	-	+	-		
	Ep9a	-	-	-	+	+	+	+		+	+	W	W	+	-	-	W	-		
	Ep9c	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-		
	36b	-	-	-	+	+	+	+	W	+	+	+	W	-	+	-	+	W		
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	48b	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
	50a	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	W	-	-	+	-	
<i>Hanseniaspora</i> sp.	MA47b	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	W	-	-	-	-	+	-

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

<i>Kluyveromyces lactis</i>	MA44c	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	W	W	-	-	-	-	+	-
	MA65f	+	-	-	-	+	+	-	+		-	-		+	-	-	-	-	-	+	-
	45a	-	-	+	+	+	+	-	+		-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Ep11d	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	W	+	-	-	W	-
	Ep17a	+	+	-	+	+	+	W	+		-	+		+	+	-	+	-	-	+	+
<i>Lipomyces starkeyi</i>	37a	-	-	-	+	+	+			+	+		+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Lipomyces</i> sp.	51b	-	-	-	+	+	+			+	+		+	+	+	-	+	-	-	W	-
<i>Pichia scolyti</i>	MA12e	+	-	-	+	+	+			+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-
	MA24b	+	+	-	+	+	+			+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-
	MA42b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	MA64b	+	-	-	+	+	+	W	+		-	+		+	+	-	+	-	-	+	-
	E9a	+	+	-	+	+	+			+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-
	Ep7b	-	-	-	+	+	+			+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-
	Ep8b	+	+	-	+	+	+			+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-
	Ep9b	+	-	-	+	+	+			+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-
	Ep10a	+	+	-	+	+	+			+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-
	Ep11a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

<i>Pichia scolyti</i>	38a	+	-	-	+	+	+		+	W	+	+	+	-	-	+	-	+	-		
	48a	+	-	-	+	+	+		+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	
	48d	+	+	-	+	+	+		+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-	
<i>Pichia scolyti</i> - ?	Ep5a	+	+	-	+	+	+		+	-		+	+	+	-	+	-	-	W	-	
<i>Pichia acaciae</i>	39b	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	-	+	-	-	+	-	
<i>Pichia fabianii</i>	MA70a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Pichia jadinii</i>	MA62f	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Pichia nakazawae</i>	MA45b	+	+	-	+	+	+	-	+		+	+	+	+	W	-	+	-	-	+	-
<i>Pichia philogaea</i>	33a	-	-	-	+	+	+		+	-		+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pichia subpelliculosa</i>	Ep11b	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	W	+	-	-	+	-	+	-
	43c	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	W	+	+	-	+	+	+
	48c	+	-	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	-	W	+	W	+	-
<i>Pichia sydowiorum</i>	40a	+	+	-	+	+	+		+			+	+		+	W	-	-	+	-	-
<i>Pichia xylosa</i>	56d	-	-	-	+	+	+	-	+		-	+		-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Pichia</i> sp.	MA41b	-	-	-	+	+	+	+	+		W	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
	MA42a	+	+	-	+	+	W	+	+	+	W	+	+	+	+	W	W	+	-	+	-
	MA46b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	W	W	+	-	+	-

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.

<i>Pichia sp.</i>	MA44d	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	MA49d	-	-	+	-	-	-	-	+		+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	W
	MA61a	+	+	-	+	+	+	+	+		+	+		+	+	-	-	+	-	+	W
	MA62d	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
	MA70b	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+		+	-	+	-	-	+	-
	Ep4a	+	-	-	+	+	+			+	W		+	+	+	+	+	-	-	+	-
	Ep7a	-	+	-	+	+	+			+	-		+	+	+	-	+	-	-	+	-
	41a	-	-	-	+	+	+			+	+		+	+	+	-	W	+	-	+	+
	48e	-	-	+	+	+	-	W	+		+	+	+	W	+	-	-	+	-	+	-
	55b	+	+	-	+	+	+	W	+		-	+		+	+	-	-	+	-	+	-
	56a	+	-	-	+	W	-	W	+	+	W	-	+	+	+	+	W	-	-	+	W
	56c	+	-	-	+	W	+	+	+	+	W	-	+	+	+	-	W	-	-	+	+
	58b	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+		+	-	-	+	+	-	+	+
<i>Torulaspota pretoriensis</i>	Ep17d	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-		W	-	+	-	-		W
<i>Saccharomyces sp.</i>	E15b	+	-	-	+		-		+	-	-		-	W	W	-	-	-	-	-	-
	E12a	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Williopsis californica</i>	Ep15b	+	-	-	+	-	+	W	+	+	-	+	+	+	W	-	-	+	+	+	-
<i>Zygozoma sp.</i>	MA47a	-	-	-	+	+	-	-	-		-	-	+	-	+	W	+	-	-	+	-

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.**Não identificadas**

MA4a	-	-	-	+	+	+		+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-			
MA5d	+	-	-	+	+	W		+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-		
MA12d	+	-	-	+	+	-		+	+	+	+	+	+	W	W	W	+	-	+	-	
MA27b	-	-	-	+	+	+		+	W		+	+	+	-	+	-	-	+	-		
MA28a	+	-	-	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	-	-	+	-		
MA28b	-	-	-	+	+	+		+	-		+	+	+	-	+	-	-	-	-		
MA30a	-	-	-	+	+	+		+	W		+	+	+	-	+	-	-	+	-		
MA30c	-	-	-	+	+	+		+	+		+	+	+	-	+	-	-	+	-		
MA42d	+	-	+	+	+	+	W	+		+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	
MA44b	-	-	-	+	+	+		+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	W	-	
MA48b	-	-	-	+	+	-	-	-		-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	
MA49c	-	-	-	+	+	+	+	+		-	+	+	+	+	W	W	+	-	+	-	
MA50c	-	-	-	+	-	-	-	-	-		-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
MA65a	-	-	+	-	-	-	-	-		W	-		-	-	-	-	-	-	-		
MA65c	-	-	-	W	-	-	-	-	-		W	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
MA65e	-	-	-	W	-	-	-	-		W	W		-	W	-	+	-	-	-		

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.**Não identificadas**

MA68d	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	W	-			
E15c	-	-	-	+	+	+			-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-		
Ep1b	-	-	-	+	+	+			+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-		
Ep1c	-	-	-	+	+	+			+	-	+	+	+	+	+	-	-	W	W		
Ep4b	-	-	-	+	-	+			+		-	+	+	-	-	+	-	+	+		
Ep8e	-	-	-	+	+	+			+		+	+	+	+	+	-	-	+	-		
6d	+	-	-	+	-	+			+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	
6e	+	-	-	+	-	+			+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	
18b	-	-	-	+	+	+			+	+	+	+	W	+	+	W	-	+	W	W	-
19d	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+		
20a	+	+	+	+	+	+			+	+	W	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
21e	+	-	-	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
27a	+	+	-	+	+	+			+	+	+	+	W	+	+	-	+	+	-	+	W
30a	-	-	-	+	+	+			+	+		+	+	+	+	-	+	-	W	-	
33c	-	-	-	+	+	W			+	+		+	+	+	-	-	-	-	-	-	
33d	+	+	-	+	+	+			+	W		+	+	+	-	+	-	-	+	+	

Apêndice 2. Continuação - Características bioquímicas demonstradas pelas leveduras isoladas neste trabalho.**Não identificadas**

43a	+	+	-	+	+	+		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	W	
43b	+	-	-	+	+	+		+		+	+	-	+	-	-	-	+	-	
45c	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
50b	+	+	-	+	-	-	W	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
62b	-	-	-	+	+	+	+	+	+	W		W	+	+	+	+	-		W

+: positivo/ -: negativo/ W: fraco

Apêndice 3. Perfil Fisiológico demonstrado pelas leveduras isoladas no estudo.

Leveduras	Cepa	Produção de Urease	Crescimento em NaCl 10%	Crescimento em NaCl 16%	Crescimento em Glicose	Produção de Caseinase	Crescimento a 37°C	Crescimento a 42°C
Basidiomicetos								
<i>Cryptococcus ater</i>	45b	+	-	-	-	+	-	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Ep11c	+	-	-	-	-	W	-
<i>Cryptococcus luteolus</i> - ?	MA27c	+	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus luteolus</i>	56e	+	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp.	MA5a	+	W	-	W	+	+	+
	MA21a	+	W	-	-	-	+	-
	MA62g	+	-	-	-	-	-	-
	Ep8d	+	W	-	-	+	W	-
	36a	+	-	-	-	-	+	-
<i>Kockovaella thailandica</i>	MA27a	+	-	-	W	-	-	-
<i>Rhodotorula futronensis</i>	62a	+	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula marina</i>	Ep13a	+	-	-	W	+	W	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	MA45d	+	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MA42c	+	-	-	-	+	-	-
	MA68b	+	W	-	-	+	W	-
	MA69a	+	-	-	W	+	+	-
	E15a	+	-	-	-	-	W	-
	Ep17b	+	-	-	+	+	W	-
	55a	+	-	-	W	+	W	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	MA64c	+	-	-	W	+	+	-
	MA65d	+	-	-	-	+	W	-

Apêndice 3. Continuação - Perfil Fisiológico demonstrado pelas leveduras isoladas no estudo.

<i>Pseudozyma rugulosa</i>	MA45c	+	W	-	W	+	+	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Ep4d	+	W	-	-	+	W	-
<i>Sporobolomyces</i> sp.	MA67b	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon asahii</i>	E15d	+	W	-	W	+	+	-
<i>Thichosporon</i> sp.	MA43a	+	W	-	-	-	+	W
	E15e	+	W	-	-	-	+	-
	Ep17c	+	-	-	W	-	+	+

Ascomicetos

<i>Candida aurangiensis</i>	38b	-	W	-	+	-	+	W
<i>Candida intermedia</i>	MA26a	-	W	-	-	-	-	-
	Ep6a	-	+	-	W	-	-	-
<i>Candida ontarioensis</i>	MA12c	-	-	-	+	-	-	-
<i>Candida litsaeae</i>	MA23d	-	+	-	+	-	+	W
	Ep6b	-	+	W	-	-	+	-
	6b	-	+	-	+	-	+	-
	20c	-	+	-	+	-	+	-
	21d	-	W	-	+	-	+	W
<i>Candida sake</i> - ?	33e	-	-	W	W	+	-	-
<i>Candida silvanorum</i> - ?	MA30b	-	-	-	+	-	+	W
<i>Candida sorbophila</i>	E14a	-	W	-	W	-	+	-
<i>Candida</i> sp.	MA24a	-	+	-	W	-	W	-
	MA43b	-	+	-	W	-	+	-
	MA46c	-	-	-	W	-	+	+
	MA49a	-	+	-	-	-	-	-
	MA50a	-	-	-	-	-	+	-
	MA50b	-	-	-	W	-	+	-
	MA62e	-	-	-	+	-	+	-

Apêndice 3. Continuação - Perfil Fisiológico demonstrado pelas leveduras isoladas no estudo.

<i>Candida</i> sp.	MA67c	-	-	-	+	-	+	-
	MA68a	-	-	-	W	-	+	-
	Ep13c	-	+	-	+	+	+	-
	18a	-	+	-	+	-	+	-
	41b	-	-	-	-	-	W	-
	44b	-	-	-	-	-	-	-
	46a	-	+	-	+	-	+	W
	54a	-	-	-	+	-	+	-
	54b	-	-	-	-	-	-	-
	54c	-	-	-	+	-	+	-
	56b	-	-	-	+	-	-	-
	57a	-	-	-	+	-	+	-
	58a	-	-	-	+	-	+	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	MA44a	-	+	-	W	-	+	-
	MA46a	-	+	+	+	-	+	-
	MA68c	-	-	-	+	-	+	-
	Ep1a	-	+	+	+	-	+	-
	Ep8c	-	+	-	+	-	+	-
	Ep13b	-	+	-	+	-	+	+
	51a	-	+	W	W	-	+	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	MA41c	-	+	-	+	-	-	-
	MA42e	-	W	-	-	-	-	-
	Ep3a	-	+	-	+	-	-	-
	Ep5b	-	+	W	-	-	-	-
<i>Debaryomyces yamadae</i>	MA41a	-	-	-	-	+	-	-
	MA49b	-	-	-	-	+	-	-
	44a	-	+	-	+	-	W	-
<i>Debaryomyces maramus</i>	Ep1d	-	+	W	+	-	W	-
	Ep4c	-	+	W	-	-	W	-

Apêndice 3. Continuação - Perfil Fisiológico demonstrado pelas leveduras isoladas no estudo.

<i>Debaryomyces castelli</i>	39a	-	+	-	+	-	+	W
<i>Debaryomyces robertsiae</i>	MA23b	-	+	-	+	-	W	W
<i>Debaryomyces</i> sp.	MA23a	-	-	-	+	-	W	-
	MA23c	-	W	-	+	-	W	-
	MA45a	-	+	-	+	-	+	+
	MA48a	-	-	-	-	-	-	-
	MA65b	-	+	-	+	-	+	+
	Ep7c	-	-	-	+	-	W	-
	Ep8a	-	+	-	W	-	-	-
	Ep9a	-	+	W	-	-	W	-
	Ep9c	-	+	-	W	-	W	-
	36b	-	+	-	+	-	+	-
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	48b	-	W	-	-	-	-	-
	50a	-	W	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora</i> sp.	MA47b	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	MA44c	-	W	-	+	-	+	-
	MA65f	-	-	-	+	-	+	-
	45a	-	-	-	-	+	-	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Ep11d	-	+	W	+	+	+	-
	Ep17a	-	-	-	+	+	+	-
<i>Lipomyces starkeyi</i>	37a	-	W	-	W	-	-	-
<i>Lipomyces</i> sp.	51b	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pichia scolytii</i>	MA12e	-	W	-	W	-	+	-
	MA24b	-	+	-	-	-	+	-
	MA42b	-	+	-	+	-	+	-
	MA64b	-	-	-	+	-	+	-
	E9a	-	+	-	W	-	+	-
	Ep7b	-	-	-	+	-	+	-
	Ep8b	-	-	-	-	-	+	-

Apêndice 3. Continuação - Perfil Fisiológico demonstrado pelas leveduras isoladas no estudo.

<i>Pichia scolyti</i>	Ep9b	-	-	-	+	-	+	-
	Ep10a	-	-	-	-	-	+	-
	Ep11a	-	-	-	+	-	+	-
	38a	-	+	-	+	-	+	-
	48a	-	+	-	-	+	W	-
	48d	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pichia scolyti</i> - ?	Ep5a	-	-	-	+	-	+	+
<i>Pichia acaciae</i>	39b	-	+	-	+	-	+	W
<i>Pichia fabianii</i>	MA70a	-	-	-	+	-	+	-
<i>Pichia jadinii</i>	MA62f	-	-	-	W	+	+	-
<i>Pichia nakazawae</i>	MA45b	-	+	-	-	+	-	-
<i>Pichia philogaea</i>	33a	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pichia subpelliculosa</i>	Ep11b	-	-	-	+	-	+	-
	43c	-	+	-	+	-	+	-
	48c	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pichia sydowiorum</i>	40a	W	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia xylosa</i>	56d	-	-	-	-	-	W	-
<i>Pichia</i> sp.	MA41b	-	W	-	-	-	-	-
	MA42a	-	+	-	W	-	+	-
	MA46b	-	+	-	+	-	+	-
	MA44d	-	+	-	+	-	+	-
	MA49d	-	W	+	+	+	+	-
	MA61a	-	-	-	+	-	+	-
	MA62d	-	W	-	+	-	W	-
	MA70b	-	+	-	-	+	+	-
	Ep4a	-	+	W	-	-	-	-
	Ep7a	-	+	-	+	+	+	+
	41a	-	-	-	+	-	+	-
	48e	-	-	-	+	-	+	-

Apêndice 3. Continuação - Perfil Fisiológico demonstrado pelas leveduras isoladas no estudo.

<i>Pichia</i> sp.	55b	-	-	-	+	-	+	-
	56a	-	-	-	W	-	+	-
	56c	-	-	-	W	-	+	-
	58b	-	-	-	+	-	-	-
<i>Torulasporea pretoriensis</i>	Ep17d	-	W	-	+	+	+	-
<i>Saccharomyces</i> sp.	E15b	-	-	-	-	-	+	+
	E12a	-	-	-	-	-	+	+
<i>Williopsis californica</i>	Ep15b	-	-	-	-	-	W	-
<i>Zygozoma</i> sp.	MA47a	-	-	-	-	-	-	-
Não Identificadas								
	MA4a	-	-	-	-	-	+	W
	MA5d	-	-	-	+	-	W	-
	MA12d	-	-	-	W	-	-	-
	MA27b	-	-	-	-	-	-	-
	MA28a	+	W	-	W	-	-	-
	MA28b	-	+	-	-	-	W	-
	MA30a	-	-	-	+	-	+	-
	MA30c	-	+	W	-	-	-	-
	MA42d	-	+	-	+	+	+	-
	MA44b	+	-	-	W	+	+	-
	MA48b	+	-	-	-	-	-	-
	MA49c	+	-	-	-	+	-	-
	MA50c	+	-	-	-	-	-	-
	MA65a	+	-	-	-	-	+	-
	MA65c	+	-	-	-	-	+	+
	MA65e	+	-	-	-	-	+	-
	MA68d	+	-	-	W	-	+	-
	E15c	-	-	-	-	-	+	W
	Ep1b	-	+	W	-	-	-	-

Apêndice 3. Continuação - Perfil Fisiológico demonstrado pelas leveduras isoladas no estudo.

Ep1c	+	W	-	-	+	-	-
Ep4b	+	-	-	-	-	W	-
Ep8e	+	W	-	-	-	W	-
6d	-	-	-	+	-	-	-
6e	-	-	-	W	-	-	-
18b	+	-	-	+	+	W	-
19d	-	W	-	W	+	+	W
20a	-	+	W	+	-	+	+
21e	+	-	-	+	-	W	-
27a	-	+	-	+	-	+	W
30a	+	-	-	+	+	W	-
33c	+	-	-	-	-	-	-
33d	+	-	-	+	+	-	-
43a	-	+	-	+	-	-	-
43b	-	-	-	-	-	-	-
45c	+	-	-	-	-	-	-
50b	-	-	-	-	-	-	-
62b	+	-	-	W	-	-	-

+: positivo/ -: negativo/ W: fraco

Apêndice 4. Listagem com a identificação presuntiva das leveduras basidiomicéticas isoladas no trabalho e a respectiva origem.

Basidiomicetos	Isolado	Origem	Basidiomicetos	Isolado	Origem
<i>Cryptococcus ater</i>	45b	Pó de madeira	<i>Rhodotorula</i>	MA69a	Monitor. do ar
			<i>mucilaginosa</i>		
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Ep11c	Excreta pombo		E15a	Excreta galinha
<i>Cryptococcus luteolus</i>	MA27c	Monitor. do ar		Ep17b	Excreta pombo
	56e	Serragem		55a	Poeira
<i>Cryptococcus sp.</i>	MA5a	Monitor. do ar	<i>Rhodotorula sp.</i>	MA64c	Monitor. do ar
	MA21a	Monitor. do ar		MA65d	Monitor. do ar
	MA62g	Monitor. do ar	<i>Pseudozyma rugulosa</i>	MA45c	Monitor. do ar
	Ep8d	Excreta pombo	<i>Sporobolomyces roseus</i>	Ep4d	Excreta pombo
	36a	Pó de madeira	<i>Sporobolomyces sp.</i>	MA67b	Monitor. do ar
<i>Kockovaella thailandica</i>	MA27a	Monitor. do ar	<i>Trichosporon asahii</i>	E15d	Excreta galinha
<i>Rhodotorula futronensis</i>	62a	Casca eucalipto	<i>Trichosporon sp.</i>	MA43a	Monitor. do ar
<i>Rhodotorula marina</i>	Ep13a	Excreta pombo		E15e	Excreta galinha
<i>Rhodotorula minuta</i>	MA45d	Monitor. do ar		Ep17c	Excreta pombo
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MA42c	Monitor. do ar			
	MA68b	Monitor. do ar			

*Monitor.: Monitoramento

Apêndice 5. Listagem com a identificação presuntiva das leveduras ascomicéticas isoladas no trabalho e a respectiva origem.

Ascomicetos	Isolado	Origem	Ascomicetos	Isolado	Origem
<i>Candida aurangiensis</i>	38b	Poeira	<i>Candida</i> sp.	54a	Pó de madeira
<i>Candida intermedia</i>	MA26a	Monitor. do ar		54b	Pó de madeira
	Ep6a	Excreta Pombo		54c	Pó de Madeira
<i>Candida litsaeae</i>	MA12c	Monitor. do ar		56b	Serragem
	MA23d	Monitor. do ar		57a	Serragem
	MA30b	Monitor. do ar		58a	Poeira
	E14a	Excreta galinha	<i>Debaryomyces castelli</i>	39a	Serragem
	Ep6b	Excreta pombo	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	MA44a	Monitor. do ar
	6b	Casca eucalipto		MA46a	Monitor. do ar
	20c	Serragem		MA68c	Monitor. do ar
<i>Candida sake</i> - ?	21d	Serragem		Ep1a	Excreta pombo
	33e	Folhas eucalipto		Ep8c	Excreta pombo
<i>Candida</i> sp.	MA24a	Monitor. do ar		Ep13b	Excreta pombo
	MA43b	Monitor. do ar		51a	Poeira
	MA46c	Monitor. do ar	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	MA41c	Monitor. do ar
	MA49a	Monitor. do ar		MA42e	Monitor. do ar
	MA50a	Monitor. do ar		Ep3a	Excreta pombo
	MA50b	Monitor. do ar		Ep5b	Excreta pombo
	MA62e	Monitor. do ar	<i>Debaryomyces yamadae</i>	MA41a	Monitor. do ar
	MA67c	Monitor. do ar		MA49b	Monitor. do ar
	MA68a	Monitor. do ar		44a	Serragem
	Ep13c	Excreta pombo	<i>Debaryomyces maramus</i>	Ep1d	Excreta pombo
	18a	Pó de madeira		Ep4c	Excreta pombo
	41b	Pó de madeira	<i>Debaryomyces robertsiae</i>	MA23b	Monitor. do ar
	44b	Serragem	<i>Debaryomyces</i> sp.	MA23a	Monitor. do ar
	46a	Poeira		MA23c	Monitor. do ar

Apêndice 5. Continuação - Listagem com a identificação presuntiva das leveduras ascomicéticas isoladas no trabalho e a respectiva origem.

Ascomicetos	Isolado	Origem	Ascomicetos	Isolado	Origem
<i>Debaryomyces sp.</i>	MA45a	Monitor. do ar	<i>Pichia jadinii</i>	MA62f	Monitor. do ar
	MA48a	Monitor. do ar	<i>Pichia nakazawae</i>	MA45b	Monitor. do ar
	MA65b	Monitor. do ar	<i>Pichia philogaea</i>	33a	Folhas eucalipto
	Ep7c	Excreta pombo	<i>Pichia subpelliculosa</i>	Ep11c	Excreta pombo
	Ep8a	Excreta pombo		43c	Serragem
	Ep9a	Excreta pombo		48c	Serragem
	Ep9c	Excreta pombo	<i>Pichia sydowiorum</i>	40a	Casca eucalipto
	36b	Pó de madeira	<i>Pichia xylosa</i>	56d	Serragem
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	48b	Serragem	<i>Pichia sp.</i>	MA41b	Monitor. do ar
	50a	Serragem		MA42a	Monitor. do ar
<i>Hanseniaspora sp.</i>	MA47b	Monitor. do ar		MA44d	Monitor. do ar
<i>Kluyveromyces lactis</i>	MA44c	Monitor. do ar		MA46b	Monitor. do ar
	MA65f	Monitor. do ar		MA49d	Monitor. do ar
	45a	Pó de madeira		MA61a	Monitor. do ar
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Ep11d	Excreta pombo		MA62d	Monitor. do ar
	Ep17a	Excreta pombo		MA70b	Monitor. do ar
<i>Lipomyces starkeyi</i>	37a	Casca eucalipto		Ep4a	Excreta pombo
<i>Lipomyces sp.</i>	51b	Poeira		Ep7a	Excreta pombo
<i>Pichia acaciae</i>	39b	Serragem		41a	Pó de madeira
<i>Pichia scolyti</i>	MA12e	Monitor. do ar		48e	Serragem
	MA24b	Monitor. do ar		55b	Poeira
	MA42b	Monitor. do ar		56a	Pó de madeira
	MA64b	Monitor. do ar		56c	Pó de madeira
	E9a	Excreta galinha		58b	Poeira
	Ep5a	Excreta pombo	<i>Torulaspora pretoriensis</i>	Ep17d	Excreta pombo
	Ep7b	Excreta pombo	<i>Saccharomyces sp.</i>	E12a	Excreta galinha
	Ep8b	Excreta pombo	<i>Williopsis californica</i>	Ep15b	Excreta pombo
	Ep9b	Excreta pombo	<i>Zygozoma sp.</i>	MA47a	Monitor. do ar
	Ep10a	Excreta pombo			
	Ep11a	Excreta Pombo			
	38a	Poeira			
	48a	Serragem			
	48d	Serragem			
<i>Pichia fabianii</i>	MA70a	Monitor. do ar			

*Monitor.: Monitoramento