



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ANA KAROLINE FREIRE DA COSTA

**ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS DE
CRYPTOCOCCUS SPP. OBTIDAS DE FONTES AMBIENTAIS E
CLÍNICAS**

FORTALEZA

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA KAROLINE FREIRE DA COSTA

**ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS DE
CRYPTOCOCCUS SPP. OBTIDAS DE FONTES AMBIENTAIS E
CLÍNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

FORTALEZA
2009

ANA KAROLINE FREIRE DA COSTA

ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS DE
CRYPTOCOCCUS SPP. OBTIDAS DE FONTES AMBIENTAIS E
CLÍNICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Fábio Fadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Prof.a Dr.a Rossana de Águiar Cordeiro
Universidade Federal do Ceará
Coorientadora

Prof.a Dr.a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

Prof.a Dr.a Nilza Dutra Alves
Universidade Federal Rural do Semiárido
Examinadora

Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó
Universidade Federal Rural do Semiárido
Examinador

C837a Costa, Ana Karoline Freire

Análise fenotípica e molecular de cepas de *Cryptococcus* spp. obtidas de fontes ambientais e clínicas/ Ana Karoline Freire da Costa. – Fortaleza, 2009.

154p. ; il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias –
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária).

1. *Cryptococcus* spp. 2. Resistência Antifúngica. 3. PCR.
4. *Mating-type*.

I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de
Veterinária.

Dedico este trabalho aos meus pais e mestres...

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, pela oportunidade de mais uma vez contar com esta instituição para a minha formação.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará, por todo o suporte técnico oferecido, e, principalmente, por ser um ambiente de orgulho e satisfação desmedidos desde minha graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

A Deus, força motora e energia vital do universo, por toda luz e esperança de vida.

Aos meus pais, José Gomes da Costa e Maria Jesus Freire da Costa, pelo amor, dedicação e apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela oportunidade concedida desde o mestrado, contribuindo de maneira fundamental para minha formação acadêmica; meu imenso respeito e admiração.

A minha coorientadora, Prof.a Dr.a Rossana de Aguiar Cordeiro, por todos os ensinamentos, entusiasmo, tempo despendido, conselhos e, principalmente, por contribuir de maneira essencial para meu amadurecimento científico.

À Prof.a Dr.a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pelo exemplo de positividade e pela contribuição especial com a presente pesquisa, incentivando, orientando, sobretudo, confiando no meu potencial.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim por dedicar tamanho esforço a um dos maiores centro de referência em Micologia Médica, o CEMM, permitindo assim a capacitação de professores, alunos e técnicos.

À Banca Examinadora, por aceitar cordialmente o convite.

A minha irmã, Mariana Freire da Costa, por contribuir para o meu desenvolvimento profissional.

Aos meus sobrinhos, Enzo Antonelli Freire de Vasconcelos e Castro e Ísis Antonelli Freire de Vasconcelos e Castro, por todo o amor dedicado.

Ao meu noivo, Paulo André de Castro e Silva Ribeiro, por todos os momentos de carinho, incentivo e compreensão.

A minha irmã de coração, Renata Félix de Lima, que esteve sempre ao meu lado desde meus primeiros passos na vida acadêmica, mas, principalmente, pela amizade sincera.

Aos meus sogros, Elisabeth Rocha de Castro e Silva e Hélio Marques Ribeiro, por incentivarem meu trabalho com tanto apreço e carinho.

A mestranda Rita Amanda Chaves de Lima e à doutoranda Joyce Fonteles Ribeiro, por me acompanharem em todas as jornadas de Biologia Molecular no CEMM, mas, principalmente, pela amizade e companherismo.

A mestranda Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, pela contribuição especial com o desenvolvimento do presente trabalho e disponibilidade em todos os momentos.

Aos alunos do CEMM por todo o apoio técnico, em especial a João Jaime Giffoni Leite, Patrícia Raquel Vieira Nogueira, Lauro Vieira Perdigão Neto e Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira, pela amizade dedicada.

Aos técnicos Teresinha de Jesus dos Santos Rodrigues, José Olavo Moraes, José Everardo Araújo de Sousa e Daniel Teixeira Lima, pelos ensinamentos e auxílios prestados com o desenvolvimento dos experimentos.

À equipe do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio técnico e, principalmente, por ser tão bem acolhida em todos os momentos.

Ao Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL-LAB), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em especial os professores doutores Benildo Souza Cavada e Ricardo Pires dos Santos, por toda a atenção, disponibilidade e treinamento durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários responsáveis pela secretaria do PPGCV, Adriana Maria Sales Albuquerque, Ana Cristina Sabóia do Nascimento e Frederico Rocha Cavalcanti, por toda a atenção e disponibilidade.

As amigas Mércia Sindeaux Frutuoso, Magaline Maria Lemos Girão, Ana Maria Sampaio, Ileana Oliveira Barros e Emanuelle Mendes de Sousa, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

A minha prima, Lidiane Freire Cândido, pelo apoio nos momentos da distração e descanso entre um experimento e outro.

Aos amigos e mentores do Grupo Espírita Paulo e Estevão (GEPE), pela contribuição moral, filosófica e doutrinária.

Às eternas amigas da época de colégio, pelas energias positivas transmitidas e momentos inesquecíveis.

Lembre-se de que você mesmo é:

o melhor secretário de sua tarefa, o mais eficiente propagandista de seus ideais, a mais clara demonstração de seus princípios e o mais alto padrão de ensino superior que seu espírito abraça. Não se esqueça igualmente de que: o maior inimigo de suas realizações mais nobres, a completa ou incompleta negação do idealismo sublime que você apregoa, o arquiteto de suas aflições e o destruidor de suas oportunidades de elevação – é você mesmo.

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

O gênero fúngico *Cryptococcus* é composto por leveduras capsuladas que apresentam capacidade de infectar e causar doença em uma larga variedade de hospedeiros, sendo *C. neoformans* e *C. gattii* as principais espécies patogênicas. No primeiro momento do presente estudo, cepas de leveduras (n=36) isoladas da cloaca e excremento de pombos, que se encontravam estocadas na micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), foram re-identificadas para a realização da análise fenotípica e genotípica de *Cryptococcus* spp. Assim como, foram coletadas e processadas amostras de material vegetal provenientes das árvores *Psidium guajava* (n = 11), *Mangifera indica* (n = 2), *Eucalyptus* sp. (n = 8), *Cassia siamea* (n = 5), *Zizyphus joazeiro* (n = 10) e *Azadirachta indica* (n = 14), localizadas próximas aos ambientes de onde foram obtidas as leveduras analisadas. Além disso, foi avaliada a sensibilidade *in vitro* das cepas ambientais de *Cryptococcus* spp. frente a anfotericina B, azólicos e caspofungina. A partir das amostras estocadas, oriundas de excretas, foram identificados *C. neoformans* var. *neoformans* (27,8%), *C. laurentii* (8,3%) e outras leveduras (63,9%), enquanto dos espécimes provenientes da cloaca não obteve-se nenhum isolado de *Cryptococcus* spp. Para as amostras vegetais, vale destacar que, *Cryptococcus* spp. não foi isolado, obtendo-se apenas uma cepa de *C. glabrata*. Resistência aos azólicos foi detectada em somente uma cepa ambiental de *C. neoformans*, a qual foi resistente para itraconazol (CIM=1 µg/ml). Outro objetivo desse estudo foi realizar um estudo comparativo entre métodos manuais (características morfológicas e perfil bioquímico), semi-automatizado API 20C AUX, automatizado Vitek 2 e PCR-REA na identificação de *Cryptococcus* spp. obtidos de fontes ambientais (n=13) e clínicas (n=22). Adicionalmente, determinou-se as variedades e sorotipos das cepas analisadas. Considerando-se o método manual como padrão-ouro de identificação, O PCR-REA foi o método diagnóstico mais rápido e que apresentou relação significativa com o método manual. O último objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil *mating-type* das cepas ambientais e clínicas de *Cryptococcus* spp. Logo, por PCR, foi possível verificar que as cepas de *Cryptococcus* spp. avaliadas eram do tipo *α-mating-type*. Por fim, a importância dessa pesquisa concentrou-se em buscar novos nichos ecológicos de *Cryptococcus* spp. em fontes vegetais; investigar o fenômeno de resistência antifúngica primária em cepas ambientais do fungo estudado, avaliar que método diagnóstico apresenta mais vantagens na identificação de *Cryptococcus* spp., incluindo a determinação das variedades e sorotipos das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*; e determinar o perfil *mating-type* dos nossos isolados.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp. Resistência Antifúngica. PCR. *Mating-type*.

ABSTRACT

Cryptococcus is a capsulated yeast that presents capacity of infecting and causing disease in a great variety of hosts, including mammals, insects and birds, with *C. neoformans* and *C. gattii* as the main pathogenic species. Thus, during the first step of this research, 36 yeast strains, isolated from cloaca and stools of pigeons, which had previously been stocked in the mycoteca of Specialized Medical Mycology Center, were investigated in order to analyse phenotypic and genotypic *Cryptococcus* spp characteristic. In addition, vegetable material was collected from *Psidium guajava* (n = 11), *Mangifera indica* (n = 2), *Eucalyptus* sp. (n = 8), *Cassia siamea* (n = 5), *Zizyphus joazeiro* (n = 10) and *Azadirachta indica* (n = 14) trees, located near the areas where the analyzed yeasts were obtained. Besides, *in vitro* susceptibility to amphotericin B, azole derivatives and caspofungin against *Cryptococcus* spp. environmental strains was assessed. Out of the stocked isolates from stools, 27.8% were *C. neoformans* var. *neoformans*, 8.3% *C. laurentii* and 63.9% belonged to other yeast species. On the other hand, no *Cryptococcus* spp. isolates were obtained from cloaca and vegetable matter. From the latter, only one isolate of *Candida glabrata* was obtained. Azole resistance was observed in only one environmental strain of *C. neoformans*, which was resistant to itraconazole (MIC=1 µg/ml). Another goal of this study was to perform a comparative analysis between manual (morphological and biochemical characteristics), semi-automated (API 20C AUX), automated (VITEK 2) and molecular (PCR-REA) methods for the identification of *Cryptococcus* spp. obtained from environmental (n=13) and clinical (n=22) sources. Additionally, the variety and the serotype to which each strain belonged was determined. Considering the manual method as the gold standard for identification, PCR-REA was the fastest diagnostic method and was significantly related to manual methods. The last goal of this study was to characterize the mating-type profile of environmental and clinical *Cryptococcus* spp. strains. Through PCR, it was possible to verify that the evaluated strains belonged to α -mating-type. Finally, the importance of this research was the pursuit of new ecological niches for *Cryptococcus* spp. within vegetable sources, the investigation of occurrence of primary antifungal resistance phenomenon among fungal environmental strains, the evaluation of the most advantageous diagnostic method for the identification of *Cryptococcus* spp., including the determination of varieties and serotypes of the species *C. neoformans* and *C. gattii* and the determination of the mating-type profile of our isolates.

Keywords: *Cryptococcus* spp. Antifungal Resistance. PCR. Mating-type.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1	Microscopia evidenciando células ovóides e capsuladas de <i>Cryptococcus neoformans</i> crescidas em caldo Sabouraud. Tinta da China, 40X.....	06
Figura 2	Colônia de aspecto mucóide e cor creme, característica do gênero <i>Cryptococcus</i>	06
Figura 3	Desenho esquemático do ciclo biológico de <i>Cryptococcus</i> spp. mostrando as interações com o meio ambiente e o hospedeiro.....	11
Figura 4	Métodos diagnósticos utilizados na identificação de <i>Cryptococcus</i> spp. A) <i>C. neoformans</i> no líquido. Tinta da China 40X. B) Aspecto mucóide de <i>C. neoformans</i> em agar-Sabouraud 2% de glicose. C) Micromorfologia de <i>Cryptococcus</i> sp. em agar-fubá-Tween. 40X. D) Uréia de Christensen. a - Teste negativo, b - Teste positivo. E) <i>Kit</i> API 20C AUX. F) Auxonograma. a e b - Halos evidenciando crescimento fúngico. G) Colônias de leveduras em meio Ágar Semente de Niger. a - Colônias marrons: <i>C. neoformans</i> , b - Colônias brancas: <i>Candida</i> sp. H) Teste de CGB. a - <i>C. neoformans</i> , b - <i>C. gattii</i> . I) Gel de poliacrilamida 6% representativo de amplificação e corte com enzimas de restrição para identificação de <i>C. neoformans</i> sor A. Linhas 1 e 2: Bandas características de sorotipo A. Linha 3: amplicon nativo. Linha 4: Marcador de peso molecular (100pb).....	20

Capítulo 3

Figure 1	Agarose gel (3%) electrophoresis, showing the restriction profile obtained with the enzymes BsmFI (A) and AgeI (B). Lanes 1 and 4: 100-bp DNA ladder; lane 2: <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> ser. A (CEMM 03-02-072); lane 3 and 6: Amplicons obtained through the amplification of the gene <i>CAP59</i> ; lane 5: <i>C. gattii</i> ser B (CEMM 03-02-079).....	97
Figure 2	Polyacrylamide gel (6%) electrophoresis showing α -mating-type profile of the isolates. Lanes 1-2: <i>C. gattii</i> ser. B (CEMM 03-03-072, CEMM 03-02-079, respectively); lane 3: negative control; lane 4: 100-bp DNA ladder; lane 5-6: <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> ser. A (CEMM 03-02-080, CEMM 05-01-084, 05-01-090, respectively).....	98

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1	Classificação de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> de acordo com suas propriedades fenotípicas, epidemiológicas e genéticas que geralmente são observadas.....	09
----------	--	----

Capítulo 1

Table 1	Main molecular techniques and specific targets used for the identification of <i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i>	67
Table 2	Genotyping methods and information retrieved for <i>C. neoformans complex</i> species	68

Capítulo 2

Table 1	Yeasts isolated from pigeon cloacae and droppings.....	74
Table 2	Minimal inhibitory concentration (MIC) of azoles, amphotericin B and caspofungin against environmental <i>Cryptococcus</i> spp. strains.....	75

Capítulo 3

Table 1	Comparison between the manual methods and the API 20C AUX semi-automated system, VITEK 2 automated system and PCR-REA for the identification of <i>Cryptococcus</i> spp. strains isolated from clinical, veterinary and environmental samples.....	96
---------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado (Amplified fragment length polymorphism)
ASN	Ágar-Semente de Niger
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Base pair
CAP	Gene para produção de cápsula
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CGB	Canavanina-glicina-azul de bromotimol
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNLAC	Gene para produção da enzima lacase de <i>Cryptococcus neoformans</i>
CNRE-I	Elementos repetitivos de <i>Cryptococcus neoformans</i>
CSF	CSF (cerebrospinal fluid)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo fosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
GACA₄	Sequências microssatélites
IFN γ	Interferon-gama
IL	Designação genética para Interleucina
IPECE	Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará
ITS	Internal Transcription Sites
Kb	Kilopares de bases de nucleotídeos, Kb=10 ³ pares de bases
LAC	Gene para produção da enzima lacase
LSU	Subunidade maior do RNA ribossomal
M13	Sequências minissatélites
MACAM	Minimal synthetic caffeic acid medium
MAP quinase	Proteína quinases ativadas por mitógenos
Mb	Megapares de bases de nucleotídeos, Mb=10 ⁶ pares de bases
MIC	Minimal Inhibitory Concentration

MLST	Tipagem de sequencia multilocus (Multilocus sequence typing)
MOPS	Ácido 2-[N-morfolino] propanossulfônico
NCCLS	National Committee for Clinical laboratory Standards
NK	Células <i>natural killer</i>
NSA	Niger seed agar
<i>PBL1</i>	Gene para produção da enzima fosfolipase B1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
PFGE	Eletroforese em campo pulsátel
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso (Random amplification of polymorphic DNA)
<i>RAS</i>	Vírus do sarcoma de rato. Representa proteínas de sinalização intracelular
rDNA	DNA ribossômico
REA	Restriction enzyme analysis
RFLP	Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (Restriction fragment length polymorphism)
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no Instituto Roswell Park Memorial
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
SNC	Sistema Nervoso Central
sp.	Espécie determinada; representa formas que foram sujeitas a uma classificação ao nível da espécie, mas que por variadas razões não foi possível atribuí-las a nenhuma das espécies conhecidas
spp.	Espécies indeterminadas; o conjunto de formas em estudo comporta representantes de várias espécies que, por alguma razão, não se considerou necessário explicitá-las
SSU	RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>URA5</i>	Gene para produção da enzima oritidina monofosforilase
Var	Variedade
VG	Variedade <i>gattii</i>
VN	Variedade <i>neoformans</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 EVOLUÇÃO DA CRIPTOCOCOSE: DO SÉCULO XIX À ERA DA BIOLOGIA MOLECULAR.....	03
2.2 FASES ANAMÓRFICA E TELEOMÓRFICA DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP.....	05
2.3 <i>C. NEOFORMANS</i> versus <i>C. GATTII</i> : VARIEDADES, SOROTIPOS E TIPOS MOLECULARES.....	08
2.4 CICLO BIOLÓGICO E ECOLOGIA DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP.....	10
2.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP.....	14
2.6 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE <i>C.</i> <i>NEOFORMANS</i> E <i>C. GATTII</i>	21
2.7 CRIPTOCOCOSE: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E ETIOPATOGENIA.....	23
3 JUSTIFICATIVA	32
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	33
5 OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo Geral.....	34
5.2 Objetivos Específicos.....	34
6 CAPÍTULO 1	35
7 CAPÍTULO 2	69
8 CAPÍTULO 3	78
9 CONCLUSÕES	99
10 PERSPECTIVAS	100
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
APÊNDICE A	128

1 INTRODUÇÃO

O *Cryptococcus* é composto por leveduras capsuladas, pertencentes a classe *Basidiomycetes*, que apresentam capacidade de infectar e causar doença em uma larga variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, insetos e aves. Dentro do gênero *Cryptococcus* existem aproximadamente 39 espécies descritas, porém *C. neoformans* e *C. gattii* destacam-se como os agentes etiológicos mais comuns da criptococose humana e animal, sendo mais raros os casos diagnosticados por outras espécies, como *C. laurentii* e *C. albidus*.

Na natureza, *C. neoformans* apresenta distribuição mundial, podendo ser encontrados em várias fontes ambientais, entretanto, relaciona-se, na maioria das vezes, com excretas acumuladas de aves, principalmente pombos-domésticos. Fato este confirmado em estudos prévios, no qual foi realizada uma busca ativa desta levedura em excrementos de pombos localizados em cativeiros e ambientes de circulação pública, na cidade de Fortaleza, Ceará. *C. gattii*, por sua vez, é descrito, muitas vezes, associado a árvores do gênero *Eucalyptus*, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais.

No que diz respeito ao modelo de investigação laboratorial da doença, este se baseia na pesquisa direta, cultura com posterior identificação bioquímica e no imunodiagnóstico. Contudo, as limitações apresentadas por esses testes podem dificultar o diagnóstico final, tais como: tempo de identificação, laboriosidade e variabilidade de resultados devido à subjetividade de interpretação dos testes fenotípicos; limitações dos métodos semi-automatizados e automatizados por muitas vezes dependerem de provas suplementares para completa identificação do isolado; ocorrência, no imunodiagnóstico, de resultados falsos positivos devido a reações cruzadas.

Todavia, um dos maiores problemas encontrados no diagnóstico da criptococose é a correta identificação das espécies *C. neoformans* e o *C. gattii* em nível de variedades e sorotipos, sendo tais características importantes no correlacionamento com as características clínicas e epidemiológicas da doença. Os métodos empregados na sorotipagem devem reconhecer as propriedades bioquímicas e antigênicas da cápsula polissacarídica do microrganismo, permitindo a correta identificação de cada sorogrupo. Atualmente, apesar de não ser aplicado ao diagnóstico de rotina, dispõe-se de métodos moleculares para detecção de sequências gênicas específicas do fungo em espécimes clínicos ou com base na cultura.

No Nordeste brasileiro, em particular no Estado do Ceará, são escassos os dados a respeito da criptococose e seus agentes etiológicos. Logo, esta pesquisa se concentrou em

buscar novos nichos ecológicos de *Cryptococcus* spp. em fontes vegetais; investigar o fenômeno de resistência antifúngica primária em cepas ambientais do fungo estudado bem como avaliar que método diagnóstico apresenta mais vantagens na identificação de *Cryptococcus* spp., incluindo a determinação das variedades e sorotipos das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* de cepas ambientais e clínicas. Por fim, esta investigação pretendeu determinar o perfil *mating-type* dos isolados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EVOLUÇÃO DA CRIPTOCOCOSE: DO SÉCULO XIX À ERA DA BIOLOGIA MOLECULAR.

O primeiro caso de criptococose humana foi descrito em 1894, por Otto Busse e Abrham Buschke, que descreveram o episódio de uma mulher de 31 anos apresentando lesão na tíbia (KNOKE; SCHWESINGER, 1994). O microrganismo isolado dessa lesão foi cultivado para estudos comparativos com isolados subsequentes e denominado *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano, na Itália, Sanfelice isolou leveduras capsuladas a em suco de pêssigo fermentado e, no ano seguinte, demonstrou sua patogenicidade em animais de laboratório e denominou a espécie *S. neoformans* (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Esse trabalho, que marcou o início do estudo do gênero *Cryptococcus*, foi publicado na Revista do Instituto de Higiene da Universidade do Cagliari, Itália.

Em 1895, Curtis denominou de *S. subcutaneus tumefasciens* uma levedura isolada de pacientes com tumor subcutâneo na base do triângulo de Scarpa e de abscesso da região lombar. Todos esses fungos foram depois identificados como semelhantes à levedura previamente descrita por Sanfelice (LACAZ et al., 2002; LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004). Em 1901, Vuillemin demonstrou que o termo *Saccharomyces* era inadequado, pois não havia formação de ascósporos nem fermentação nesses isolados, sugerindo tratar-se de um novo gênero, denominando-o de *Cryptococcus*. No ano de 1935, Benham estudou os isolados classificados como *Saccharomyces*, *Torula* e *Cryptococcus*, por meio de sua morfologia, patogenicidade e reatividade ante a fatores séricos, concluindo que todos pertenciam a um só gênero e espécie. Posteriormente, essa mesma autora propôs a designação *Cryptococcus neoformans*, a qual se tornou definitiva (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004).

Em animais, o *Cryptococcus* foi isolado pela primeira vez a partir de linfonodos de um bovino, no ano de 1895, por Sanfelice. Em 1901, Vuillemin e Klein isolaram o fungo de uma lesão pulmonar em suíno. No ano seguinte, descreveu-se o primeiro caso em equinos, com observação da levedura em tecido pulmonar (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972). Os casos de criptococose em animais foram relatados esporadicamente até os anos 1950 e, somente em 1952, foi descrito o primeiro caso em gatos e, no ano seguinte, o primeiro em cães (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972).

Os primeiros isolamentos de *C. neoformans* em solo, madeira em decomposição, habitat de aves e, particularmente, excrementos de pombos, foram realizados no final do século XIX, fundamentando o conceito de origem ambiental da infecção. O estudo que marcou, porém, a relação saprobiótica de *C. neoformans* com matéria orgânica rica em excreta de aves, principalmente fezes secas de pombos, foi o de Emmons (1955). Outros habitats também foram descritos, como ninhos e solos contaminados, tornando-se evidente a distribuição cosmopolita e urbana do fungo e da micose (EMMONS, 1951; LAZÉRA et al., 2000).

Na década de 1970, dois tipos sexuais de *C. neoformans* foram descritos, *MATa* e *MATa*, que, sob determinadas condições laboratoriais, produzem hifas verdadeiras e basidiósporos férteis (KWON-CHUNG, 1975; 1976a; 1976b). Essa forma morfológica, no entanto, é considerada atípica e raramente é descrita em hospedeiros humanos e animais, sendo os blastoconídeos (forma assexuada) as células predominantemente isoladas no ambiente e na clínica (SHADOMY; UTZ, 1966; FREED et al., 1971; LURIE; SHADOMY, STILL, 1971; STAIB et al., 1977; GAZZONI et al., 2008; LIN, 2009).

Antes do surgimento da aids, a criptococose era considerada uma doença rara, relacionada a deficiências na imunidade celular, ocorrendo em um pequeno percentual da população (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Dos anos 1980, em diante, com a pandemia da aids, bem como a utilização de fármacos imunossupressores, houve um aumento na incidência da criptococose, sendo a doença, atualmente, a quarta causa mais frequente de infecção oportunista em pacientes HIV positivos (ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994; FRANZOT et al., 1997; CALVO et al., 2001; PAPPALARDO; MELHEM, 2003; JARVIS; HARRISON, 2007; SHIRLEY; BADDLEY, 2009).

No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram entre os anos de 1941 e 1944, descritos por Carlos da Silva Lacaz e Floriano de Almeida (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Desde então, vários estudos epidemiológicos são realizados no País (LACAZ; RODRIGUES, 1983; ROZEMBAUM et al., 1992; ROZEMBAUM; GONÇALVES, 1994; AOKI et al., 1999; LAZÉRA et al., 2000; CALVO et al., 2001; HORTA et al., 2002; OHKUSU et al., 2002; FERNANDES et al., 2003; NISHIKAWA et al., 2003; IGREJA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; DELGADO et al., 2005; TRILLES et al., 2008).

Nos anos seguintes, *C. neoformans* foi dividido em cinco sorotipos, A, B, C, D e AD, mediante sorotipagem baseada em reação imunológica com antissoro produzido contra diferentes epítomos do polissacarídeo que compõe a cápsula dessa levedura (IKEDA et al., 1982; NISHIKAWA et al., 2003; D'SOUZA et al., 2004). Análises fenotípicas,

epidemiológicas, ecológicas, fisiológicas e genéticas dividiram a espécie em três variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). Atualmente, com base em dados de filogenia, fenotipagem e tipagem genética, a variedade *gattii* passou a ser classificada no plano da espécie (KWON-CHUNG et al., 2002). Análises filogenéticas sugerem que *C. gattii* diverge de *C. neoformans* em aproximadamente 37 milhões de anos e que a variedade *grubii* e a variedade *neoformans* divergem entre si em aproximadamente 19 milhões de anos (XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000; MARRA et al., 2004).

Ao final dos anos 1990, um conselho internacional se reuniu para dar início ao projeto de sequenciamento do genoma do *C. neoformans*. Heitman et al. (1999) publicaram estudo que discutia a importância de tal projeto para a biologia e virulência desse microrganismo. Logo, muitos esforços foram necessários para completar e anotar a sequência genômica do fungo, para análises comparativas com sequências de outras cepas, variedades e espécies, bem como para determinar a relação de sua patogênese com o homem.

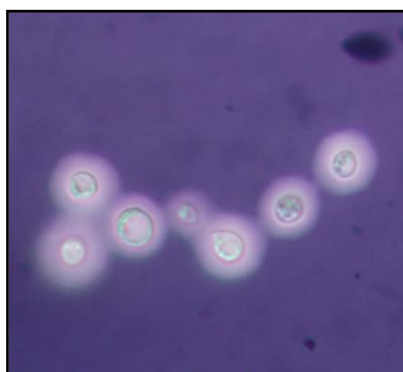
Em meados de 2005, por meio de um estudo multicêntrico, todas as características a respeito do projeto genoma para *C. neoformans* foram descritas. Inicialmente, o sequenciamento genômico foi realizado para duas cepas de *C. neoformans* sorotipo D, a JEC21 e a B3501-A. Um genoma de 20 Mb foi sequenciado, o qual continha, aproximadamente, 6500 genes estruturais ricos em *introns* e *transposons*, bem como codificava um transcriptoma abundante em mensagens antisense (sequências-molde para síntese de RNA mensageiro). Verificou-se, ainda, que o *C. neoformans* codificava genes únicos para seu processo de virulência e que a comparação entre duas cepas fenotipicamente distintas revelou variação no conteúdo de genes entre os dois genomas (LOFTUS et al., 2005). O projeto genoma trouxe, portanto, novas ideias para o estudo da criptococose e seus agentes etiológicos, especialmente no que diz respeito a biologia e mecanismos de patogênese deste basidiomiceto (HUGHES et al., 2008).

2.2 FASES ANAMÓRFICA E TELEOMÓRFICA DE *CRYPTOCOCCUS* SPP.

Após décadas de estudo, sabe-se hoje que o gênero *Cryptococcus* é composto por aproximadamente 39 espécies e caracteriza-se por apresentar células de formato esférico ou ovóide, com diâmetros de aproximadamente 2-8 µm (FELL et al., 1998; DE HOOG et al., 2000; LIN, 2009). As espécies que contemplam esse gênero são basidiomicetos pertencentes ao clado Filobasidiella, da ordem Tremalles, podendo apresentar reprodução sexuada e

assexuada no seu ciclo de vida (TAKEO et al., 1993; CHATURVEDI et al., 2000, SCORZETTI et al., 2002; BARRETO DE OLIVEIRA; BOEKHOUT; THEELEN 2004; XUE et al., 2007).

É na fase assexuada ou anamorfa, que leveduras do gênero *Cryptococcus* se apresentam como células haplóides, normalmente com envoltório capsular, formatos arredondados ou ovalados, sem presença hifas ou pseudo-hifas (**figura 1**). Durante a reprodução, observam-se brotamentos singulares ou múltiplos, surgindo de qualquer local da parede celular, podendo os blastoconídeos resultantes permanecer ligados à célula-mãe por um colo estreito. Isolados de *Cryptococcus* spp. crescidos em meios cultivos clássicos, como ágar-Sabouraud, após 48 horas de incubação a temperaturas de 25 a 37 °C, geralmente apresentam colônias de coloração creme, aspecto brilhante, textura mucóide e margem lisa (**figura 2**) (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004).



(Fonte: CEMM, 2009)

Figura 1. Microscopia evidenciando células ovóides e capsuladas de *Cryptococcus neoformans* crescidas em caldo Sabouraud. Tinta da China, 40X.



(Fonte: CEMM, 2009)

Figura 2. Colônia de aspecto mucóide e cor creme, característica do gênero *Cryptococcus*.

A fase teleomórfica ou sexuada ainda não foi observada na natureza, mas é bem demonstrada em condições de laboratório, sendo designadas de *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, correspondente a *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente (KWON-CHUNG; BENNET, 1992). Esta fase se caracteriza por apresentar hifas dicarióticas (presença de dois núcleos de origens diferentes) e, para que a reprodução sexuada ocorra, é necessária uma compatibilidade bipolar, ou seja, a existência de alelos opostos no locus sexual, *MAT α* e *MATa* (KWON-CHUNG; HILL; BENNETT, 1981; ALSPAUGH; DAVIDSON; HEITMAN, 2000; LENGELER et al., 2000; MARRA et al., 2004). Esses

mating-types ou tipos sexuais apresentam papel importante na epidemiologia e virulência do microrganismo (ESPOSTO et al., 2004).

C. neoformans e *C. gattii* podem realizar *mating* intravarietades (sorotipo A x sorotipo D), assim como interespécies (B x D, C x D), mas observa-se que, nestes casos, a viabilidade dos basidiósporos é reduzida, com muitas progênies diplóides e aneuplóides resultantes desses cruzamentos, indicando, portanto, que a divergência genômica diminui a taxa de meiose (LEGENLER; COX; HETMAN, 2001).

O sistema *mating-type* é estudado, principalmente, em isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, podendo ser determinado por meio do cruzamento de cepas compatíveis, utilizando-se meios de cultura específicos (ágar-suco V-8, por exemplo) ou por métodos moleculares (KWON-CHUNG, 1976b; LEE et al., 2005). Estes últimos são geralmente realizados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo especialmente úteis para confirmação do *mating* em casos de cepas autoférteis, estéreis ou isolados diplóides ou aneuplóides (LIN; HEITMAN, 2006; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2009).

Embora o sistema *mating* do *Cryptococcus* compartilhe características fisiológicas e genéticas de outros fungos, estudos demonstram que há características particulares que o tornam único: formação de células *MAT-a* e *MAT- α* distribuídas ao acaso em quatro cadeias de esporos no ápice da estrutura de frutificação, na proporção de 1:1, após a fase meiótica, assim como o tamanho e a composição genética do *locus MAT*. Tais características despertaram a curiosidade dos pesquisadores para esse gênero (LENGELER et al., 2002; MACLELLAND et al., 2004).

Dentre o gênero *Cryptococcus*, o primeiro gene *mating-type* específico identificado foi o feromônio *MF α 1* para *C. neoformans* (MOORE et al., 1993). Observou-se que este gene estava localizado em uma região de aproximadamente 40 kb e que continha parte do *locus MAT α* (MACLELLAND et al., 2004). Estudos posteriores verificaram a presença de genes específicos para *MAT α* e *MATa*, o *STE12 α* (homólogo do *STE12* em *Saccharomyces cerevisiae*) e o *STE12a*, respectivamente (HULL et al., 2002).

Em seguida, com o mapeamento físico do *locus MAT*, verificou-se que, além do *STE12 α* , havia vários outros genes *α -mating-type* específicos, homólogos ao feromônio *MF α 1*, responsáveis pela ativação da cascata proteína quinase (*MAP* quinase), contidos nesse mesmo *locus*. Ademais, observou-se que o *locus MAT α* continha dois outros genes, o *PRT α* , um fator de iniciação de tradução, e um gene para miosina, uma proteína importante responsável pela formação de hifas durante o *mating* ou na frutificação haplóide (CHANG et

al., 2000). A descoberta desses dois genes dentro do *locus MAT* não era prevista, portanto, foi de grande surpresa para os pesquisadores, pois correspondia a dois genes, não interligados, para o processo de *mating*. Este tipo de descoberta, até então, não havido sido descrito para outro grupo fúngico (MCCLELLAND et al., 2004).

Assim, sucessivos estudos foram mostrando que o sistema sexual da levedura em estudo apresenta características bem peculiares. Atualmente, acredita-se que a descoberta deste sistema de reprodução se tornou o evento-chave no desenvolvimento de pesquisas genéticas que resultaram numa explosão de conhecimentos acerca da virulência, ciclo de vida e relações filogenéticas entre isolados de *Cryptococcus* spp (LIN, 2009).

Verifica-se que o sistema de reprodução sexuada do gênero *Cryptococcus* é bastante estudado para *C. neoformans* e *C. gattii*, entretanto, para as outras espécies, é possível encontrar alguns trabalhos com *C. laurentii*. Até meados dos anos 1970, praticamente nada se conhecia a respeito da reprodução sexuada de *C. laurentii*, porém, em 1973, Kurtzman conseguiu isolar cepas *mating-type* opostas desta espécie, obtidas de amostras vegetais de milho e trigo. O autor observou que tais cepas realizavam *mating* somente entre elas, mas quando eram colocadas em meios de cultura com cepas-padrão de *C. laurentii*, este fenômeno não ocorria. Desde então, estudos comparativos são realizados entre estas cepas capazes de realizar *mating* e cepas padrão de *C. laurentii* (TAKASHIMA et al., 2003).

2.3 *C. NEOFORMANS* versus *C. GATTII*: VARIEDADES, SOROTIPOS E TIPOS MOLECULARES

C. neoformans e *C. gattii*, assim como outros microrganismos, possuem características fenotípicas, epidemiológicas e genéticas que permitem classificá-los em nível de variedades, sorotipos e tipos moleculares (**tabela 1**) (MEYER et al., 2003; ENANCHE-ANGOULVANT et al., 2007; BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008; HUSTON; MODY, 2009).

Tabela 1. Classificação de *C. neoformans* e *C. gattii* de acordo com suas propriedades fenotípicas, epidemiológicas e genéticas descritas.

Espécie, variedade, sorotipo	Patogenia	Termotolerância <i>in vitro</i> (°C)	Sensibilidade à glicina (Teste de CGB)	Sensibilidade aos antifúngicos	Habitats	Distribuição geográfica	Tipos Moleculares	Sequência (16S/23S rRNS)	AFLP – CAP59 (pb)
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (sorotipo A)	Oportunista (SNC)	38 - 40	Sensível	Sensível	Solo, excreta de aves	Cosmopolita	VNI	Sem substituições	394 ou 400
							VNII		
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (sorotipo D)	Oportunista (SNC, pele)	38 - 40	Sensível	Sensível	Solo, excreta de aves	Cosmopolita (principalmente Europa)	VNB	Sem substituições	380 ou 382
							VNIV		
<i>C. gattii</i> (sorotipo B)	Infecção primária; lesões pulmão e SNC	35	Resistente	Sensibilidade dose-dependente	Material vegetal (<i>Eucalyptus</i> sp.)	Áreas tropicais e subtropicais	VGI	Substituição 2 nucl / 16S; 10 nucl / 23S	371, 373 ou 380
							VGII		
<i>C. gattii</i> (sorotipo C)	Infecção primária; lesões pulmão e SNC (menor prevalência)	35	Resistente	Sensibilidade dose-dependente	Material vegetal (<i>Eucalyptus</i> sp.)	Áreas tropicais e subtroicais	VGIII	Substituição 2 nucl / 16S; 10 nucl / 23S	366
							VGIV		
Sorotipo AD (híbrido)	Oportunista (SNC)	38 - 40	Sensível	Sensível	Solo, excreta de aves	Cosmopolita (Europa)	VNIII	Sem substituições	382 e 384

VN: variedade *neoformans*; VG: variedade *gattii*; nucl: nucleotídeo; pb: pares de base;

No que diz respeito às outras espécies de *Cryptococcus*, verifica-se que alguns estudos são focados na espécie *C. laurentii* (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007). Com base nas sequências D1/D2 da região 26S do DNA ribossômico (rDNA) e da região do Espaço Interno Transcrito (ITS), bem como pelas propriedades fisiológicas e bioquímicas de quinze cepas de *C. laurentii*, Takashima et al. (2003) observaram que havia um elevado grau de heterogeneidade intraespecífica entre os isolados, logo, os autores propuseram uma reclassificação das cepas de *C. laurentii* em cinco espécies diferentes dentro de dois grupos filogenéticos: grupo filogenético I, representado pelas espécies *C. peneaus* e *C. carnescens*, e grupo filogenético II, representado pelas espécies *C. laurentii*, *C. aureus* e *C. flavescens*. Esta classificação baseia-se ainda em variações observadas no conteúdo C=G do DNA e no padrão eletroforético de proteínas celulares (VANCANNEYT et al., 1994; SUGITA et al., 2000).

2.4 CICLO BIOLÓGICO E ECOLOGIA DE *CRYPTOCOCCUS* SPP.

As características clínicas da criptococose, assim como os métodos diagnósticos para detecção desta micose se tornaram mais bem definidos nos últimos anos. Em contrapartida, no que diz respeito à interação do fungo com o meio ambiente, ainda há várias características dessa relação que carecem estudos mais aprofundados. Com as descobertas advindas dos estudos em laboratório da fase sexuada e da investigação molecular da população estrutural do microrganismo no meio ambiente, novas perspectivas direcionam o estudo desse patógeno de vida caracteristicamente saprófita (LIN; HEITMAN, 2006; XUE et al., 2007).

Durante a fase saprófita do ciclo biológico, *C. neoformans* e *C. gattii* permanecem no ambiente, associados, principalmente, a excrementos de pombos, material vegetal em decomposição e ocos de árvores vivas, fazendo interação ainda com outros microrganismos do solo, como amebas e nematóides (CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003). Acredita-se que a criptococose é, então, iniciada por meio da inalação de propágulos do fungo, depositados nos alvéolos pulmonares e, desde pulmão, se dissemina por via hematogênica para outros sítios corporais (**figura 3**). A história natural da doença está relacionada principalmente ao comprometimento da imunidade celular do hospedeiro, resultante de enfermidades e

atividades imunossupressoras, tais como aids e tratamento com corticosteróides (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

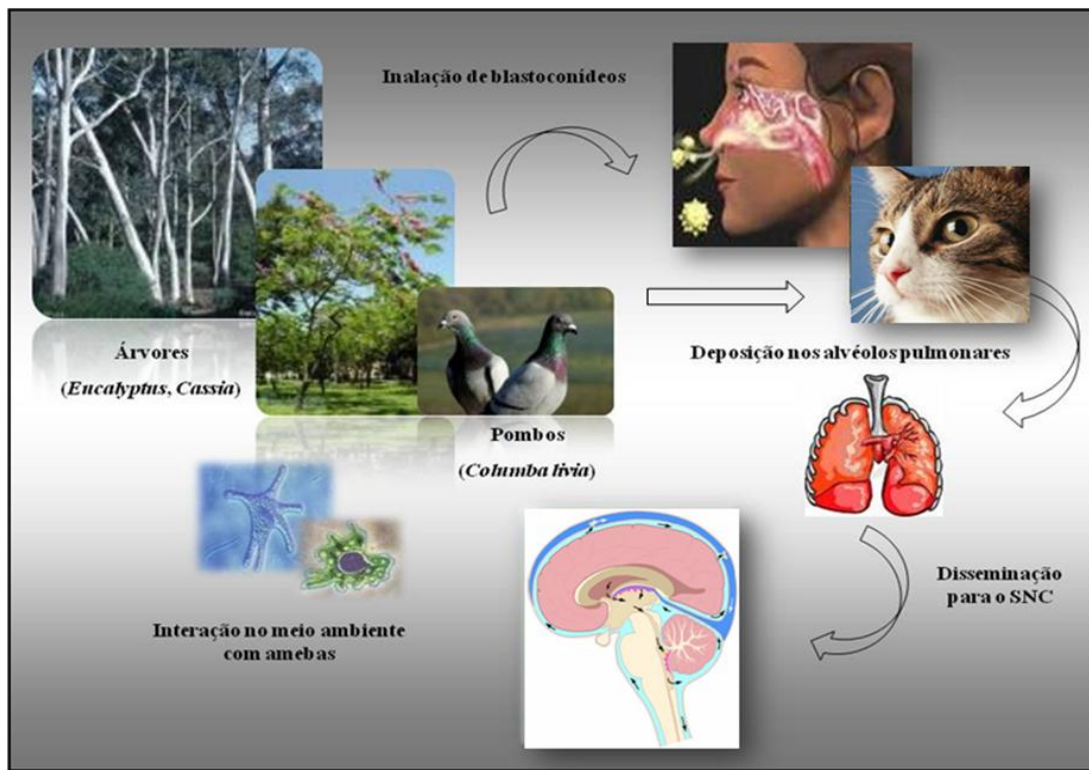


Figura 3. Desenho esquemático do ciclo biológico de *Cryptococcus* spp. mostrando as interações com o meio ambiente e o hospedeiro. Adaptado de Lin e Heitman, 2006.

C. neoformans e *C. gattii* são predominantemente isolados na forma assexuada, tanto de isolados clínicos como de amostras ambientais. Por ser um basidiomiceto heterotático, pode ainda passar por uma fase dimórfica e se transformar na forma filamentosa, por dois caminhos distintos: conjugação de células haplóides α e *a mating-type* para produzir filamentos dicarióticos, como também frutificação monocariótica, que produz filamentos e basidiósporos sob condições laboratoriais (LIN; HEITMAN, 2006).

A forma de vida saprófita e ubíqua do *Cryptococcus* intriga os pesquisadores a respeito de como e por que esse patógeno humano se associa a plantas e de que forma o ambiente influencia no seu ciclo de vida. Acredita-se que o fungo, principalmente o *C. gattii*, estabeleça esse tipo de relação para completar seu ciclo biológico pelo processo de *mating*, pois foi observado que componentes como inositol e ácido indol-acético,

existentes em plantas do gênero *Arabidopsis* e *Eucalyptus*, estimulem a reprodução sexuada do fungo (XUE et al., 2007).

O *C. neoformans* é cosmopolita, sendo a variedade *grubii* predominantemente descrita na Europa, ocorrendo em uma variedade de nichos ecológicos, como substratos orgânicos e habitats relacionados, entre os quais se destacam: construções antigas, torres de igreja, estábulos, porões, barracões, cavernas, além de excretas de aves, fezes de morcegos e baratas, ninhos de vespa, suco de frutas, leite, recintos de coelhos, buracos de tatus, solo e várias espécies vegetais (LAZÉRA et al., 1998, 2000; CASADEVALL; PERFECT, 1998; FORTES, 2001; TRILLES et al., 2003; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005; ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008). Esta associação, no entanto, é observada, especialmente, com excretas acumuladas de pombos urbanos, material vegetal em decomposição e ocos de árvores vivas (LAZÉRA et al., 2000; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005; SOARES et al., 2005; REIMÃO et al., 2007; COSTA et al., 2009).

Trabalhos pioneiros de Emmons (1951) já faziam referência à relação saprofítica do fungo com fezes secas de pombos, bem como solos contaminados com estes excrementos em ambientes urbanos. No Brasil, estudos realizados na cidade de Curitiba, com amostras oriundas de ambientes públicos que continham acúmulo de excretas de pombos, bem como com fezes obtidas de passeriformes e psitacídeos localizados em cativeiros mostraram positividade significativa para recuperação de cepas de *C. neoformans* (CICCHON, 2006; LUGARINI et al., 2008).

O isolamento de *C. neoformans* em excretas de aves está ligado à presença de um ambiente favorável ao crescimento do microrganismo encontrado neste nicho, assim como à sua adaptação bioquímica, que lhe confere habilidade de assimilar creatina, uma amina nitrogenada, composta de dois aminoácidos (glicina e arginina), importante fonte de nitrogênio para produção de proteínas (NARDELLI et al, 2005). Além disso, o fungo também pode utilizar o ácido úrico e as purinas, presentes em abundância nos excrementos, como fonte de nitrogênio, o que facilita a sua multiplicação (CASADEVALL; PERFECT, 1998; CHEE; LEE, 2005).

É frequentemente relatado que as excretas envelhecidas de aves oferecem um substrato orgânico mais favorável para o desenvolvimento do fungo, pois possuem menor quantidade de bactérias e, desta forma, a competição pelo crescimento é reduzida, contribuindo assim para a elevada densidade populacional de células de *C. neoformans* neste substrato (REOLON et al., 2004). Apesar do isolamento abundante de

C. neoformans em excretas, o fungo dificilmente é isolado do aparelho digestório de aves (ROSARIO et al., 2005; CAFARCHIA et al., 2006a; 2006b; ROSARIO et al., 2008).

Poucos estudos conseguiram isolar *C. neoformans* da cloaca de pombos (ROSARIO et al., 2005). Essa ausência de isolamento decorre das más condições encontradas para o crescimento do fungo, possivelmente pela elevada temperatura corporal (41,5 °C) destas aves e pela alta concentração de amônia presente nas fezes frescas, que alcaliniza o meio (SORREL; ELLIS, 1997; CASADEVALL; PERFECT, 1998; LIN; HEITMAN, 2006). Portanto, a multiplicação do fungo acontece nas fezes, e, estando num ambiente com falta de limpeza, acúmulo de excretas e aumento de temperatura, por meio do ar, o microrganismo é capaz de contaminar as excretas adjacentes e assim se propagar (LIN; HEITMAN, 2006; PEDROSO et al., 2007; ROSARIO et al., 2008).

Com relação ao *C. gattii*, este possui distribuição geográfica mais restrita e, embora seja isolado com menor frequência, a partir de excretas de aves, é descrito em associação, principalmente, com árvores do gênero *Eucalyptus*, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais (SORREL; ELLIS, 1997; LAZÉRA et al., 2000; RANDAWA et al., 2003; KIDD et al., 2004; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2006). Na natureza, *C. gattii* foi isolado, primeiramente, no sul da Austrália, em associação ao *Eucalyptus camaldulensis* (ELLIS; PFEIFFER, 1990). Posteriormente, outras espécies de eucaliptos, tais como: *E. tereticornis*, *E. rudis* e *E. gomphocephala*, bem como novas espécies vegetais foram sugeridas como possíveis nichos ecológicos do fungo (ABEGG et al., 2006; KHAN et al., 2007). No Brasil, *C. gattii* foi isolado de material vegetal em decomposição e ocos de árvores do gênero *Moquilea*, *Cassia* e *Ficus*, protegidos dos efeitos dessecatadores dos raios solares, evidenciando um possível habitat para o fungo (LAZÉRA et al. 1998; 2000; FORTES et al., 2001; TRILLES et al., 2003).

Os fatores climáticos de cada região, tais como temperatura, umidade e exposição à luz, podem influenciar na recuperação de cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* oriundas do ambiente (MONTENEGRO; PAULA, 2000; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005; QUINTERO et al., 2005). Estudos conduzidos por Ellis e Pfeiffer (1990) propuseram que a formação e dispersão de basidiósporos de *C. gattii* ocorrem intensificadamente durante a estação de florescimento do eucalipto. Tal característica, entretanto, não está bem estabelecida, pois estudos posteriores não conseguiram

verificar esse tipo de associação (LAZÉRA et al. 1998; LAZÉRA et al. 2000; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005).

No que diz respeito ao ciclo biológico e ecologia de outras espécies de *Cryptococcus*, *C. laurentii* e *C. albidus* são isolados, principalmente, de excretas de aves, solo contaminado e material vegetal, podendo transitoriamente colonizar a pele humana. O *C. laurentii* destaca-se por apresentar capacidade adaptativa aos mais variados ambientes, pois é isolado desde lugares com climas tropicais a regiões com temperaturas abaixo de zero, como Antártica (KURTZMAN; FELL, 1998; NARAYAN et al., 2000; PAVLOVA et al., 2001; KHAWCHAROENPORN, APISARNTHANARAK, MUNDY, 2007; PEDROSO et al., 2007). Acredita-se a criptococose ocasionada por estas espécies também se inicie mediante inalação de células do fungo e, do pulmão, se dissemina por via hematogênica para outros sítios corporais (KHAWCHAROENPORN, APISARNTHANARAK, MUNDY, 2007).

A compreensão do ciclo de vida e dos aspectos ecológicos de *Cryptococcus* spp. pode fornecer dados importantes de como as partículas infecciosas são produzidas, além de um melhor entendimento da interação do fungo com o meio ambiente, contudo mais estudos devem ser conduzidos no intuito de melhor estabelecer tais características (GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005; LIN; HEITMAN, 2006).

2.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *CRYPTOCOCCUS* SPP.

O diagnóstico laboratorial dos agentes da criptococose baseia-se, principalmente, na visualização de leveduras capsuladas presentes no espécime clínico em preparações com tinta da China (**figura 4A**) e no subsequente isolamento do microrganismo em meio de cultura para sua confirmação (**figura 4B**) (OSUNA et al., 2008). Logo, a pesquisa direta e a cultura, técnicas realizadas com relativa facilidade, constituem o exame mais prático e de custos menos elevados para os laboratórios de rotina, apresentando maior sensibilidade em amostras de líquido (MOREIRA et al., 2006).

Além dos testes supracitados, pode-se realizar o exame histopatológico para visualização do microrganismo. Nos cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina, as células de *Cryptococcus* spp. normalmente se apresentam com formatos esféricos, ovais ou elípticos, de coloração rosada ou azul-pálido, medindo entre 2 a 20µm

de diâmetro. A cápsula pode ser estreita ou espessa em relação ao seu diâmetro e não se cora devido à sua natureza mucopolissacarídica, evidenciando um halo claro que envolve os blastoconídeos (PEDROSO; CANDIDO, 2006).

Nos tecidos, a coloração com mucicarmim de Meyer é um método útil para diferenciar *C. neoformans* de outros fungos com tamanho e aparências similares, pois evidencia a cápsula em vermelho, facilitando o seu reconhecimento (PEDROSO; CANDIDO, 2006). No entanto, a impregnação com prata pelo método de Gomori-Grocott e o método de PAS (coloração ácido periódico Schiff) são as mais utilizadas para a detecção do fungo no tecido. Outra técnica útil é a coloração Fontana Masson, que pode ser utilizada para evidenciar o depósito de melanina na parede do *C. neoformans*, auxiliando na sua identificação (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Caso não seja possível a visualização microscópica de leveduras capsuladas, sugestivas de *Cryptococcus*, a identificação pode ser realizada ou complementada por micromorfologia e um conjunto de provas bioquímicas da cultura fúngica (DE HOOG et al., 2000; LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004). Mediante a prova do microcultivo em meio ágar-fubá Tween 80 ou ágar-arroz Tween 80, é possível observar células esféricas de tamanhos irregulares, sem hifas ou pseudo-hifas (**figura 4C**) (diâmetros maiores do que às células de *C. glabrata*) e, algumas vezes, separadas por material capsular.

O gênero *Cryptococcus* é capaz de hidrolisar ureia, importante para diferenciar das espécies do gênero *Candida*, que não possuem tal característica (**figura 4D**). *Cryptococcus* spp. não possui habilidade de fermentar carboidratos, mas assimila, por metabolismo oxidativo, açúcares como glicose, maltose, sacarose e galactose (DE HOOG et al., 2000). A capacidade de assimilar inositol como única fonte de carbono pode ser útil para diferenciar das espécies de *Rhodotorula* (WINN JR. et al., 2008).

A assimilação de carboidratos pode ser realizada por procedimentos semiautomatizados e automatizados, como o API 20C (BioMérieux) (**figura 4E**) e o Vitek 2 (BioMérieux), respectivamente, assim como por métodos manuais (**figura 4F**). Ademais, este gênero não assimila nitrato como única fonte de nitrogênio inorgânico e não realiza redução a nitrito, bem como é sensível a cicloeximida, não crescendo em meios seletivos com sua presença em concentrações de 0,2 a 0,5% (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004).

A habilidade do gênero *Cryptococcus* de produzir melanina com base em substâncias fenólicas presentes em meios de cultura, conferindo às colônias pigmentações escuras, é especialmente útil para isolamentos do fungo de culturas mistas e/ou ambientais (**figura 4G**) (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; PINTO JUNIOR et al., 2006; COSTA, 2007). A literatura mostra que a maioria das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* produz pigmento marrom quando cultivadas em meios de cultura com substratos fenólicos, enquanto para as outras espécies muitas vezes esse fenômeno não ocorre (CARFACHIA et al., 2006a). Tal característica constitui uma prova bioquímica atrativa para o gênero, chamada prova da fenoloxidase, sendo realizada inclusive em alguns laboratórios de rotina (CAPOOR et al., 2007). Há pesquisas que demonstram a utilização desse recurso como forma de estabelecer a diferenciação de *C. neoformans* das outras espécies do gênero (CHEN et al., 2001; CARFACHIA et al., 2006a), contudo, existem outros estudos mostrando que isolados de *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus* podem apresentar produção de melanina, de maneira menos pronunciada do que para *C. neoformans* e *C. gattii* (IKEDA et al., 2002; PEDROSO et al., 2009).

A quimiotipagem de *C. gattii* e *C. neoformans* é comumente realizada por intermédio do meio ágar-canavanina-glicina-azul de bromotimol (teste de CGB) (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982; LUGARINI, 2007). Apenas *C. gattii* é resistente à canavanina, utilizando a glicina disponível no meio para seu crescimento e, no período de um a cinco dias, mudam a cor verde original do meio para a cor azul. Já foram descritas, no entanto, cepas de *C. neoformans* com habilidade de resistir a elevadas concentrações de L-canavanina (**figura 4H**) (NAKAMURA et al., 1998; KHAN et al., 2003). Com relação às outras espécies de *Cryptococcus*, o meio de CGB geralmente não é utilizado, entretanto, estudos conduzidos por Bauters et al. (2001) mostram que cepas clínicas de *C. laurentii* foram capazes de crescer na presença de L-canavanina e glicina.

As desvantagens apresentadas pelos testes fenotípicos relacionam-se principalmente com tempo de identificação e laboriosidade, além de ocorrer variabilidade de resultados em virtude da subjetividade de interpretação (WENGENACK; BINNICKER, 2009). Os métodos semiautomatizados e automatizados de identificação de leveduras, por sua vez, como API 20C AUX e VITEK, permitem a obtenção de resultados em aproximadamente 72 horas. Muitas vezes, porém, apresentam limitações por dependerem de provas suplementares para

completa identificação do isolado, como teste da urease e assimilação de outras fontes de carbono (GUNDES; GULENC; BRINGOL, 2001; MASSONET et al., 2004)

Uma opção para diagnóstico da criptococose são os ensaios de detecção de antígeno polissacarídicos capsulares, que apresentam elevada sensibilidade e rápidos resultados. O teste é realizado por aglutinação de partículas de látex com fluidos corporais (líquor, soro e urina), permitindo a identificação das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* em nível de sorotipos. É realizado, contudo, apenas em centros especializados, uma vez que os reagentes apresentam custo elevado (MOREIRA et al., 2006). Reações falsopositivas podem ocorrer relacionadas ao fator reumatóide, presença de células de *Trichosporon* spp. e bacilos Gram-negativos na amostra, devendo, então, ser correlacionadas com o quadro clínico e laboratorial do caso sob investigação (FERREIRA; ÁVILA, 2001; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; HOUSTON; MODY, 2009).

Atualmente, apesar de não ser aplicado ao diagnóstico de rotina, existem métodos moleculares para detecção de sequências gênicas específicas de *C. neoformans* e *C. gattii* em espécimes clínicos ou com base na cultura (PASCHOAL et al., 2004; BOVERS et al., 2007). As ferramentas moleculares apresentam elevadas sensibilidade e especificidade de detecção, com potencial para resolver as limitações do diagnóstico convencional, podendo ser empregadas tanto na identificação como na tipagem e epidemiologia molecular do microrganismo.

Várias sequências-alvo são empregadas na identificação e tipagem de *Cryptococcus* spp., dentre as quais merecem destaque *URA5* (oritidina monofosforilase), *CAP59* (produção de cápsula), M13 (sequências minissatélites) e ITS (18S, 5,8S e 28S). Estudos feitos por Paschoal et al. (2004) demonstram que a detecção de *C. neoformans* em amostras de líquido cefalorraquidiano pode ser otimizada pela técnica da PCR convencional. Esses autores realizaram ampliações das áreas ITS e 5,8S do RNA ribossômico (rRNA) (de 72 amostras de líquido obtidas de pacientes com e sem aids, sendo eles acometidos por meningite criptocócica (n=56) e meningite ocasionada por outros agentes (n=16). Os resultados demonstraram que a técnica apresentou alta sensibilidade (92,9%), superior à cultura (85,7%) e ao teste da tinta da China (76,8%). Os autores acreditam que as amostras negativas para o PCR podem ter acontecido em razão de interferentes no processo de extração de DNA, como componentes do líquido, antibióticos, agentes retrovirais, proteases e outras drogas administradas durante o tratamento da aids.

Como descrito, a diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii* nos seus respectivos sorotipos (A, B, C, D e AD) pode ser realizada por meio da detecção do antígeno polissacarídico por intermédio do imunodiagnóstico (LEAL et al., 2008). A determinação dos sorotipos, entretanto, pode ser realizada com sensibilidade e especificidade por técnicas moleculares (**figura 4I**) (LUO; MITCHEL et al., 2006).

Recentemente, Leal et al. (2008) utilizaram uma variação da PCR convencional, a PCR *multiplex*, que permitiu a diferenciação entre *C. neoformans* e *C. gattii* por meio da amplificação de regiões gênicas específicas (codificadoras de aminotransferases) para cada espécie. Foram analisados 129 isolados clínicos humanos, um de origem veterinária e um ambiental, previamente identificados por sorotipagem e cultivados em meio de CGB. Neste estudo, os resultados do *multiplex* obtiveram 100% de concordância com a sorotipagem, enquanto para o CGB, das 131 cepas, seis divergiram. O meio CGB é muito susceptível a variações de pH, logo tem permitido gerar falsos positivos.

Com o objetivo de realizar um método molecular rápido e confiável na identificação dos cinco sorotipos de *C. neoformans* e *C. gattii*, Enanche-Angoulvant et al. (2007) empregaram a técnica do PCR com análise de enzima de restrição (REA) para analisar 63 isolados de *C. neoformans* e nove de *C. gattii*, previamente sorotipados, além de uma cepa de *C. uniguttulatus* para avaliar a especificidade do teste. A região-alvo escolhida foi o gene *CAP59* (codificadora para região capsular) e, para a análise do perfil de restrição, foram empregadas as enzimas *BsmFI*, *HpaII* e *AgeI*. Desta forma, todas as cepas puderam ser diferenciadas nos cinco sorotipos representativos, apresentando o sorotipo AD um perfil de restrição misto entre os sorotipos A e D.

O conhecimento dos sorotipos de *C. neoformans* e *C. gattii* permite informações adicionais a respeito da epidemiologia do agente, assim como torna possível associar o sorotipo encontrado com as características clínicas (tipos de manifestações clínicas e sensibilidade aos antifúngicos) apresentadas (SORRELL, 2001; HOANG et al., 2004).

Atualmente, uma das metodologias mais revolucionárias na identificação de importantes patógenos é a PCR em tempo real. Trabalhos conduzidos por Levy et al. (2008) confirmaram por meio desta técnica um diagnóstico de pericardite por *C. neoformans* em um paciente transplantado, mediante a amplificação do gene 18S e 28S do rRNA. O método permitiu a amplificação diretamente do fluido pericardial.

No que diz respeito a práticas moleculares aplicadas na detecção de *C. laurentii* baseada em amostras clínicas, Bauters et al. (2001) relataram um caso de paciente

imunodeprimido, cujas amostras clínicas de *swabs* da orofaringe mostraram repetidos isolamentos do fungo durante o tratamento. Os autores realizaram, além de testes fenotípicos, ampliações das regiões D1/D2 do rRNA para identificação do fungo. Por meio do emprego região ITS como alvo de amplificação na PCR, outras espécies também são diagnosticadas: *C. magnus* obtido de amostras de *swabs* do canal auditivo de um gato (KANO et al., 2004), sendo este o primeiro relato do fungo nesta espécie animal; e *C. adeliensis* em culturas mistas de leveduras patogênicas (LEAW et al., 2006).

É possível verificar que a técnica da PCR promoveu avanços no diagnóstico da criptococose, especialmente pela a amplificação de regiões gênicas do rDNA, assim como desde genes para produção de cápsula (*CAP*) e oritidina monofosfato pirofosforilase (*URA5*). Ainda há restrições, porém, quanto ao custo de equipamentos e reagentes, quando comparado com os testes microbiológicos convencionais. Logo, não existe ainda protocolo universal de amplificação, principalmente com suporte em espécimes clínicos.

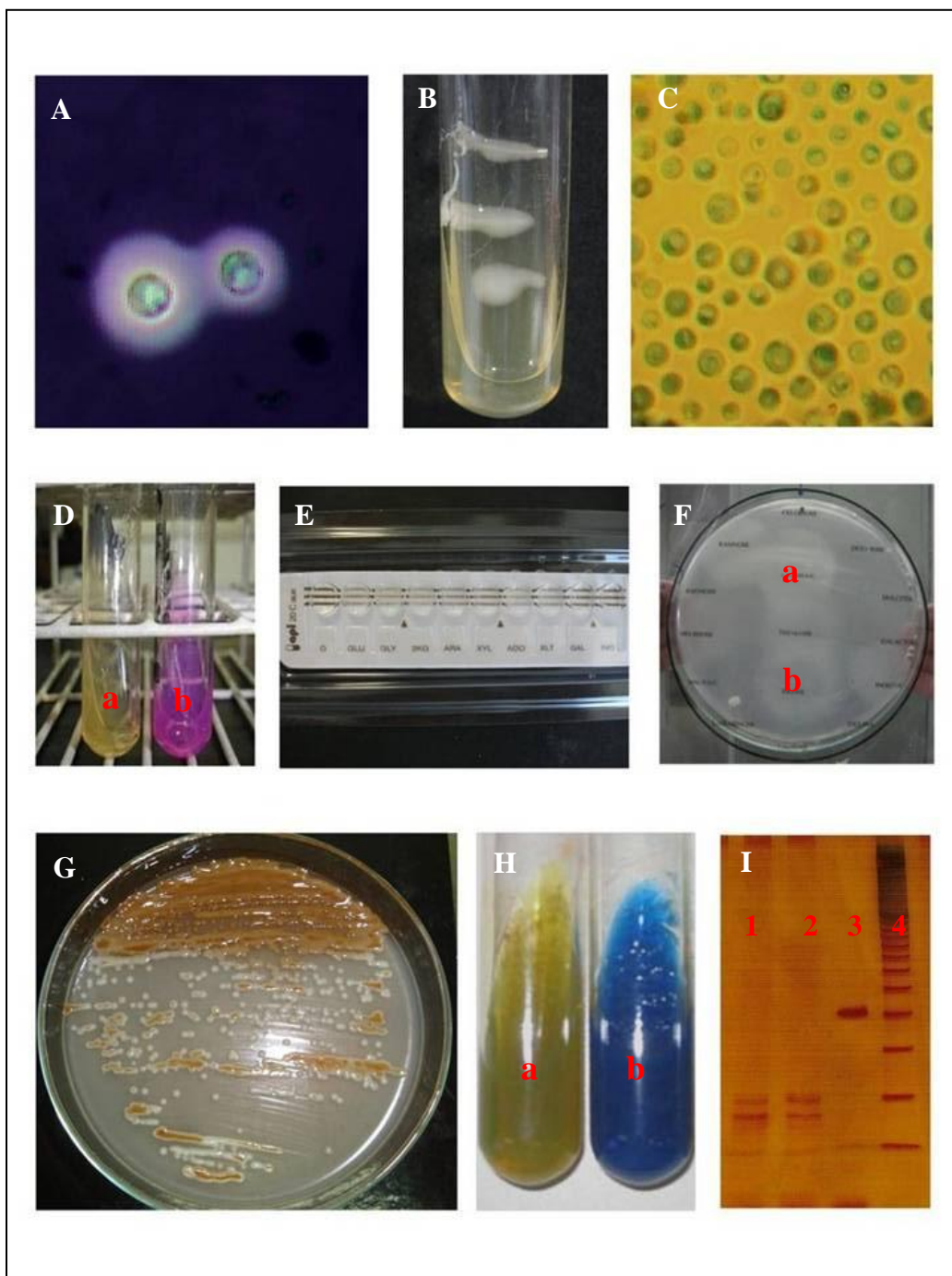


Figura 4. Métodos diagnósticos utilizados na identificação de *Cryptococcus* spp. A) *C. neoformans* no líquido. Tinta da China 40X. B) Aspecto mucóide de *C. neoformans* em agar-Sabouraud 2% de glicose. C) Micromorfologia de *Cryptococcus* sp. em ágar-fubá-Tween. 40X. D) Ureia de Christensen. a - Teste negativo, b – Teste positivo. E) *Kit* API 20C AUX. F) Auxonograma. a e b – Halos evidenciando crescimento fúngico. G) Colônias de leveduras em meio Ágar Semente de Niger. a – Colônias marrons: *C. neoformans*, b – Colônias brancas: *Candida* sp. H) Teste de CGB. a – *C. neoformans*, b – *C. gattii*. I) Gel de poliacrilamida 6% representativo de amplificação e corte com enzimas de restrição para identificação de *C. neoformans* sor A. Linhas 1 e 2: Bandas características de sorotipo A. Linha 3: amplicon nativo. Linha 4: Marcador de peso molecular (100pb).

2.6 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *C. NEOFORMANS* E *C. GATTII*

Nos últimos anos, o aumento da população imunocomprometida, especialmente após a pandemia da aids e os tratamentos imunossupressores, a incidência de infecções sistêmicas por fungos também aumentou (NUCCI; COLOMBO, 2007; COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2008; ANTONIEWICZ et al., 2009). Além disso, as melhorias obtidas com a terapia antibacteriana permitiram a instalação de um maior número de infecções fúngicas oportunistas (COLOMBO; ALVES, 2004; PRADO et al., 2009), sendo estas caracterizadas tanto pelo seu aumento em frequência, bem como pela diversidade de fungos isolados e pelo aumento da gravidade das infecções (MOREIRA et al., 2006; DUNCAN; STEPHAN; CAMPBELL, 2006; QUAZZAFI et al., 2007).

As pesquisas com testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* para cepas de *Cryptococcus* spp. são realizadas com o intuito correlacionar o perfil de isolados clínicos e ambientais, de uma determinada região, perante diferentes antifúngicos, especialmente os que são utilizados no tratamento da criptococose (CHANDENIER et al., 2004; ALMEIDA et al., 2006; CAPOOR et al., 2008). Atualmente, a terapia anticriptocócica recomendada inclui anfotericina B sozinha ou combinada com 5-flucitosina, seguida de fluconazol para manutenção da terapia (SAAG et al., 2000; SAR et al., 2004, RACHID; SCHECHTER, 2008; BICANIC et al., 2008).

Dentre os métodos mais utilizados, *in vitro*, para avaliar a susceptibilidade de *Cryptococcus* spp. ante os diferentes antifúngicos, destacam-se o Etest e a microdiluição em caldo (CLSI, 2002; KHAN et al., 2007; COSTA et al., 2009). O Etest consiste de uma fita plástica, que contém a droga em diferentes concentrações expressas no reverso de uma fita, colocada sobre a superfície de um meio basal sólido, e apresenta equivalência aceitável com os métodos de diluição em caldo padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (COLOMBO; ALVES, 2004). A microdiluição em caldo é realizada em placas de microdiluição de 96 poços e permite a análise de maior número de amostras, além de apresentar maior facilidade de execução e economia de material (CLSI, 2002).

Normalmente, cepas humanas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* são sensíveis, *in vitro*, aos diferentes antifúngicos (KOBAYASHI et al., 2005; TAY et al., 2006; KHAN et al., 2007). Pfaller et al. (2005) avaliaram a sensibilidade *in vitro* de 1.811 isolados clínicos de *C. neoformans*, obtidos de 100 laboratórios de regiões geográficas diferentes, entre os anos de 1990 a 2004, ante a anfotericina B, flucitosina, fluconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Os autores verificaram que a resistência *in vitro* entre os isolados de *C. neoformans* a esses antifúngicos não aumentou durante os 15 anos avaliados. No Brasil, pesquisa realizada em Goiânia avaliou a susceptibilidade, *in vitro*, de *C. neoformans* e *C. gattii* obtidos de pacientes com aids. Todas as amostras dos sorotipos A e D foram susceptíveis às drogas anfotericina B e itraconazol e, a maioria, ao fluconazol. Já para o sorotipo B, as cepas avaliadas apresentaram elevado índice de resistência ao fluconazol, demonstrando, assim, a importância para o clínico na escolha do medicamento e do esquema terapêutico a ser empregado no tratamento (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; FERNANDES et al., 2003).

Achados de resistência antifúngica *in vitro* em cepas clínicas e ambientais de *Cryptococcus*, embora mais raros, são relatados (COSTA et al., 2009). Alguns estudos descrevem tal fenômeno em cepas clínicas de *C. neoformans* para fluconazol, anfotericina B e voriconazol, bem como em isolados de *C. gattii* para itraconazol, flucitosina e fluconazol (CHANDENIER et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007; SOARES et al., 2008). Em amostras ambientais de *C. neoformans*, a resistência antifúngica primária já foi detectada para itraconazol e fluconazol (SOARES et al. 2005; PEDROSO et al., 2006).

Com relação a outras espécies de *Cryptococcus*, estudos demonstrando o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* são escassos, entretanto, em uma pesquisa realizada com isolados ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* (n=16), *C. albidus* (n=17), *C. laurentii* (n=14) e *C. uniguttulatus* (n=3) ante a anfotericina B, fluconazol, flucitosina e itraconazol, parte das cepas analisadas mostrou perfil de resistência às drogas testadas (PEDROSO et al., 2006).

Sendo assim, mais investigações devem ser realizadas para monitorar a resistência antifúngica em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, podendo, desta forma, alertar a comunidade médico-científica quanto à seleção de cepas clínicas resistentes induzidas pela terapêutica antifúngica, bem como o aparecimento de amostras ambientais primariamente resistentes.

2.7 CRIPTOCOCOSE: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E ETIOPATOGENIA

A criptococose é considerada importante causa de mortalidade e morbidade entre as micoses oportunistas, especialmente em pacientes acometidos pela aids (HORTA et al., 2002; PAPPALARDO; MALHEM, 2003; IDNURM et al., 2005; JONGWUTIWES; SUNGKAHUPARPH; KIERTIBURANAKUL, 2008; MANOSUTHI, CHOTTANAPUND, SUNGKANUPARPH, 2008). A incidência da doença varia em diferentes partes do mundo, apresentando-se entre 5 a 10% na Europa Ocidental e Estados Unidos e mais de 20% na África Central e leste da Ásia (MITCHELL; PERFECT, 1995; MENTZ, et al 2001; LIFSON et al., 2006; JARVIS; HARISSON, 2007).

No Brasil, o número crescente de pacientes portadores de HIV favorece o aumento das infecções causadas por este fungo e, de acordo com dados do Ministério da Saúde, entre o período 1980 e 2002, 6% das infecções oportunistas associadas à aids foram causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2002). Em estudo recente acerca de micoses sistêmicas como causa primária de morte no País, observou-se que houve aumento no número de casos de criptococose de 78 para 89 casos por ano, entre os anos de 1996 a 2006. No Ceará, cinco mortes foram relatadas durante esse período. Além disso, dentre os pacientes portadores de aids, cuja causa de óbito foi associada a micoses sistêmicas, a criptococose foi apontada em 50,9% das declarações (PRADO et al., 2009). No Ceará, evidências clínicas de profissionais do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) mostra que, nos últimos dez anos, houve a média de sete novos casos por ano de criptococose em pacientes HIV positivos, situando-se entre as principais micoses associadas a esses doentes, sendo recorrente em parte dos casos diagnosticados.

A maioria das infecções criptococócicas em hospedeiros imunocomprometidos é causada por *C. neoformans*, sendo o sorotipo A observado em até 90% dos casos, seguido pelos sorotipos B e AD, nesta sequência (BOEKHOUT et al., 2001; LITVINTSEVA et al., 2005; HUSTON; MODY, 2009). Os sorotipos D e C são menos relatados, exceto em alguns países europeus e algumas áreas dos Estados Unidos, como Califórnia e Nova Iorque (LIN; HEITMAN, 2006).

No Brasil, o sorotipo A mostra-se prevalente, em especial nas regiões Sul, Sudeste (São Paulo é o estado que apresenta a maior taxa da doença) e Centro-Oeste,

tanto em isolados clínicos quanto ambientais, ocorrendo casos também nas regiões Norte e Nordeste (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; NISHIKAWA et al. 2003). No Ceará, estudos sobre a epidemiologia da criptococose são escassos (COSTA, 2007) e os casos descritos são apenas no plano de espécies, portanto, dados sobre os sorotipos são inexistentes ou não reportados (MENEZES et al. 2002).

A criptococose por *C. gattii* possui localização geográfica mais restrita, predominando em regiões tropicais e subtropicais (BOEKHOUT et al., 2001; SORREL, 2001; KIDD et al., 2007). Sua ocorrência é observada principalmente em países da América do Sul, como Brasil, Colômbia, Venezuela, Peru e Argentina, sul dos Estados Unidos, África Central, Austrália, Nova Guiné e Sudeste da Ásia. No Brasil, a prevalência de *C. gattii* é considerada uma das mais altas na América do Sul (MONTENEGRO; PAULA, 2000), parecendo esta espécie ser endêmica na região Nordeste (NISHIKAWA et al., 2003).

A ocorrência de surtos da criptococose por *C. gattii* é rara (BARÓ et al., 1998; RASO et al., 2004), sendo o maior deles registrado na ilha de Vancouver, Canadá. A doença atingiu 38 casos humanos, entre 1999 e 2001, com letalidade de 10%. A maior parte dos indivíduos era imunocompetente, sexo masculino, apresentando predominância de lesões pulmonares, seguida de meningite. A micose também foi diagnosticada em animais domésticos, 18 gatos e 17 cães, incluindo animais silvestres, seis golfinhos, dois furões e duas lhamas (KIDD et al., 2004). A emergência de um patógeno considerado tipicamente tropical ou subtropical em área temperada chamou atenção e, desde então, a criptococose passou a ser doença de notificação compulsória no Canadá e foram propostos estudos de cooperação e vigilância da infecção por este agente (WATERS, 2007).

A criptococose ocorre mais comumente em homens adultos, sendo rara a incidência em crianças com relatos apenas esporádicos (LOPES et al., 1997; DARZÉ et al., 2000; FERNANDES et al., 2003; MEYER et al., 2003; LITVINTSEVA et al., 2005; FERNANDES et al., 2000; CÔRREA et al., 2002; ZOU et al., 2006; LEAL et al., 2008; EGHWRUDJAKPOR; ALLISON, 2009). No Brasil, houve relatos da criptococose nesta última faixa etária, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do País, parecendo esse fator estar ligado à desnutrição ou ao crescimento do número de crianças imunocomprometidas. O principal agente etiológico implicado nos episódios descritos foi o *C. gattii* (ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994; CÔRREA et al., 1999; CÔRREA et al., 2002; LEIMANN; KOFMAN, 2008).

Muitos trabalhos relatam a criptococose em seres humanos após exposição a excretas de aves (LAGROU et al., 2005). Já foi observada a ocorrência desta micose em pacientes transplantados ou sob terapia imunossupressora, que mantinham contato com aves exóticas (cacatua, calopsita) (NOSANCHUK et al., 2000; SHRESTHA et al., 2004; LAGROU et al., 2005). A comprovação da participação de aves como fonte de infecção em seres humanos foi demonstrada pela similaridade bioquímica e genética apresentada pelas cepas ambientais e clínicas recuperadas (FRANZOT et al., 1997; NOSANCHUK et al., 2000; LAGROU et al., 2005)

Dados epidemiológicos a respeito da criptococose em animais são escassos quando comparados a ocorrência em humanos. Os agentes etiológicos mais comuns são *C. neoformans*, seguido de *C. gattii*, sendo a doença relatada em diversas espécies de animais, principalmente domésticos (CASTELLÁ; ABARCA; CABAÑES, 2008). Dentre estes, o gato (*Felis domesticus*) é o mais afetado, acometendo animais de qualquer idade, independentemente do sexo e raça (BEATTY et al., 2000; KERL et al., 2003; DUNCAN et al., 2006; JULIANO et al., 2006). No Brasil, a doença em felinos é mais frequentemente relatada em animais adultos, machos e da raça Siamesa (PEREIRA; COUTINHO, 2003). A criptococose também é documentada em outras espécies domésticas, tais como cães, equinos, ovinos, caprinos, bovinos e aves (MONGA; MOHAPATRA; KALRA, 1970; PAL; RANDHAWA, 1976; MENDONZA et al., 1984; RAIDAL; BUTLER, 2001; MALIK et al., 2003; KERL et al., 2003; RASO et al. 2004; KOMMERS et al., 2005; BOWLES; FRY, 2009).

Em animais silvestres, a criptococose já foi descrita em coalas, golfinhos, furões, pássaros e raposas (LIN; HEITMAN, 2006). *C. gattii* é a espécie mais isolada em coalas (*Phascolarctos cinereus*), animais nativos da Austrália. Isso deve estar relacionado ao hábito destes animais se alimentarem e viverem sobre árvores do gênero *Eucalyptus*, logo, já que *C. gattii* possui forte associação com plantas deste gênero, os animais ficam mais susceptíveis à aquisição do microrganismo (KROCKENBERGER et al., 2002).

No Estado do Ceará, informações documentadas a respeito da criptococose em animais são escassas. Entretanto, no Centro Especializado em Micologia Médica foi diagnosticado um caso de criptococose por *C. neoformans* var. *grubii* em um gato macho, sem raça definida, de aproximadamente oito anos, residente no Município de Baturité, apresentando suspeita clínica de leishmaniose tegumentar americana.

Pesquisas de tipagem genotípica dos agentes da criptococose, que utilizam diferentes métodos de análise para amplas séries de isolados de origem humana, animal

e ambiental, possibilitaram o estudo da epidemiologia molecular de *C. neoformans* e *C. gattii*. Tais estudos objetivam determinar os tipos moleculares predominantes em cada região do mundo, verificar a diversidade genotípica do perfil de isolados obtidos de fontes diferentes, bem como realizar a vigilância de genótipos atípicos circulantes (KIDD et al., 2007; TRILLES et al., 2008; FRASÉS et al., 2009).

As principais técnicas empregadas nos estudos de epidemiologia molecular são a cariotipagem, PCR *fingerprinting*, RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), RFLP (polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição) AFLP (polimorfismo de tamanho dos fragmentos amplificados e tipagem de sequência multilocus (MLST) (BOEKHOUT; VAN BELKUM, 1997; KELLER et al., 2003; MEYER et al., 2003; ESCADÓN et al., 2006; BOVERS et al., 2008a; BYRNES et al., 2009a). Metodologias mais específicas, no entanto, como a análise de sequências de iteínas, bem como o desenvolvimento de sondas baseadas em sequências de *transposons*, auxiliam os estudos sobre a epidemiologia molecular da criptococose e seus agentes (BUTLER; POULTER, 2005; DIAZ; FELL, 2005; KELLER et al., 2006).

Assim, com base em sequências polimórficas de DNA observadas pela presença de bandas específicas e reproduzíveis, determinadas pela PCR *fingerprinting* e pelo AFLP, os tipos moleculares encontram-se classificados da seguinte maneira: VNI/AFLP1 (variedade *grubii*, sorotipo A), VNII/AFLP1A (variedade *grubii*, sorotipo A), VNIII/AFLP3 (sorotipo AD), VNIV/AFLP2 (variedade *neoformans*, sorotipo D), VGI/AFLP4 (sorotipo B), VGII/AFLP6 (sorotipo B), VGIII/AFLP5 (sorotipo B) e VGIV/AFLP7 (sorotipo C) (LIN; HEITMAN, 2006).

Os tipos moleculares predominantes mundialmente são o VNI e VGI, porém, na América Latina, a distribuição e ocorrência dos tipos moleculares, principalmente de *C. gattii*, mostram divergência genética dos demais continentes (MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2003; BOEKHOUT et al., 2001; FRASÉS et al., 2009). No Brasil, isolados clínicos e ambientais exibem considerável diversidade genética de *C. neoformans* e *C. gattii*, demonstrando ocorrência simultânea de variados tipos/genótipos (VNI/AFLP1, VNIV/AFLP2 E VGII/AFLP6) em ocos de árvores, por exemplo (BARRETO DE OLIVEIRA; BOEKHOUT; THEELEN, 2004). É possível observar ainda diferenças regionais na distribuição destes genótipos, pois, nas regiões Sul e Sudeste do País, o tipo molecular predominante é VNI, atingindo, sobretudo, pacientes imunocomprometidos, especialmente aids (IGREJA et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2007). Enquanto isso, no Nordeste e Norte, o agente mais descrito é o tipo VGII,

demonstrando ser endêmico na região, causando doença principalmente em imunocompetentes (NISHIKAWA et al., 2003; TRILLES et al., 2008).

Outra característica estudada pela epidemiologia molecular da criptococose é a distribuição do perfil *mating-type* dos diferentes isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* (ESCADÓN et al., 2006; TRILLES et al., 2008). No passado, essa característica era determinada somente por meio de técnicas manuais de cultivo em meios específicos, contudo, principalmente após o desenvolvimento da PCR, os estudos de *mating* se intensificaram (MOORE; EDMAN, 1993; CHATURVEDI et al., 2000; LEE; CHANG; KWON-CHUNG, 2005). O α -*mating-type* é o tipo mais prevalente mundialmente, tanto em isolados clínicos como nos ambientais (LIN; HEITMAN, 2006; MATSUMOTO et al., 2007). Estudos realizados na Colômbia, entretanto, mostraram incidência elevada do tipo *a* em amostras clínicas e ambientais de *C. gattii* (ESCADÓN, et al., 2006).

A epidemiologia da criptococose é extensivamente explorada no mundo inteiro, contudo, no Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, os dados epidemiológicos moleculares ainda são escassos (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; TRILLES et al., 2008). Desta forma, mais informações são necessárias no sentido de elucidar a distribuição dos tipos moleculares entre os isolados brasileiros.

A criptococose em humanos começa como uma infecção pulmonar e se dissemina, por via hematogênica, atingindo outros órgãos, como pele, rins, próstata, bem como regiões oculares e ósseo articulares (QUAZZAFI et al., 2007; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008). Produz, no entanto, lesões principalmente no Sistema Nervoso Central (SNC) (MOREIRA et al., 2006; WINN JR. et al., 2006; HUSTON; MODY, 2009). A falha na resposta imune é o principal fator predisponente para o desenvolvimento da infecção, em particular nos pacientes imunodeprimidos, como portadores da aids, neoplasias linfoproliferativas ou sarcomas, transplantados ou sob tratamento imunossupressor (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Nos animais, a criptococose atinge, sobretudo, o sistema nervoso central, sendo descrita em alguns casos associada a lesões de face, principalmente de mucosa nasal (CASTELLÁ; ABARCA; CABAÑES, 2008; CABAÑES, 2008). Os gatos, que são os animais mais acometidos, apresentam sobretudo infecções no trato respiratório superior (DUNCAN et al., 2006; CABAÑES, 2008). Alguns fatores predisponentes podem estar relacionados, como vírus da leucemia felina (FeLV) e vírus da imunodeficiência felina

(FIV), neoplasias, diabetes, intervenções cirúrgicas e tratamentos imunossupressores (CASTELLÁ; ABARCA; CABAÑES, 2008).

No que diz respeito aos casos de criptococose por outras espécies, *C. laurentii* foi descrito em aproximadamente 20 casos humanos até o momento, sendo a pele e o SNC os principais órgãos afetados (CHENG et al., 2001; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007). *C. albidus* já foi relatado, ocasionando lesão de pele em paciente diabético (NARAYAN et al., 2000). Em animais, recentemente foi descrito o primeiro caso de criptococose felina por *C. albidus*, sendo a levedura encontrada tanto no líquido como em aspirados de punções realizadas em linfonodo apresentado pelo animal (KANO et al., 2008). Desta forma, verifica-se que, tanto em humanos como em animais, outras espécies de *Cryptococcus* aparecem como potenciais patógenos (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007).

De acordo com o que é observado, quando blastoconídeos de *Cryptococcus* são inalados e chegam até o pulmão, a primeira linha de defesa no hospedeiro são os macrófagos alveolares (FAN et al., 2005). As células do fungo podem ser eficientemente fagocitadas e mortas por tais macrófagos, ou poderá haver evasão do patógeno e inibição da fagocitose em razão dos polissacarídeos capsulares (FELDMESSER; NOVIKOFF; CASADEVALL, 2000). Em alguns casos, contudo, após a fagocitose, o fungo poderá ser capaz de sobreviver dentro dos macrófagos e se autoprotger contra componentes da resposta inata, tais como complemento e fatores imunes alveolares, ou até mesmo contra a ação de drogas antifúngicas (FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL et al., 2001; FAN et al., 2005).

Estudos de expressão gênica mostraram que genes relacionados com o transporte de açúcares, ferro e aminoácidos são superregulados durante a sobrevivência de células de *C. neoformans* no interior de macrófagos de murinos (FAN et al., 2005). Além disso, quase todo o *locus MAT* pode aumentar sua expressão em menos de 24 horas de internalização do microrganismo, sugerindo assim uma importante relação do *mating* com a patogenicidade do fungo. A predominância de células *MAT α* no meio ambiente e nos isolados clínicos, bem como seu maior grau de virulência, quando comparadas com as células *MAT α* , sugerem que as diferenças fisiológicas e genéticas entre os dois tipos sexuais levam à sobrevivência de células *MAT α* (KNOW-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; LENGELER et al., 2000; McCLELLAND et al., 2004; BARCHIESI et al., 2005).

Apesar da primeira linha de defesa da resposta imune contra células de *Cryptococcus* ser realizada pelos macrófagos alveolares, o uso de modelos animais geneticamente modificados ou naturalmente mutantes demonstra que a resposta imune requer ainda células do tipo T *helper* 1 (*Th1*), mediadas pela ativação de T-CD4+ e T-CD8+, além de haver secreção de algumas citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-18 e TNF- α) (HUFFNAGLE; DEEPE, 2003). Uma variedade de outras células, incluindo células dendríticas e células exterminadoras naturais (NK) também são implicadas na resposta imune contra *Cryptococcus* (KAWAKAMI, 2004; WOZNIAK; VYAS; LEVITZ, 2006).

A patogenia da criptococose está ligada basicamente a três fatores clássicos de virulência do *Cryptococcus*: a habilidade de crescer a 37 °C, os polissacarídeos capsulares do fungo e sua capacidade de se ligar a glicoproteínas e a síntese de melanina por meio de uma fenoxidase específica (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; PEDROSO et al., 2009; LIN, 2009). Esses três fatores, que estão sob controle genético, são o alvo de muitos estudos que objetivaram identificar quais genes estão envolvidos no processo de virulência (BARLUZZI et al., 2000; KRAUS et al., 2004; CRAMER et al., 2006; OKABAYASHI, HASEGAWA; WATANABE, 2007; ROSA E SILVA et al., 2008).

Vários genes associados com o desenvolvimento do fungo em condições de temperaturas elevadas foram identificados para *C. neoformans* e *C. gattii*. Verificou-se que o gene *RAS* (proteína de sinalização intracelular), por exemplo, o qual codifica para proteínas que participam de cascatas de sinalizações para o *mating*, filamentação e crescimento do fungo, é preferencialmente expresso a temperaturas elevadas, em torno de 37 °C (ALSPAUGH et al., 2000; NICHOLS; PERFEC; ALSPAUGH, 2007). Ademais, alguns trabalhos mostram que a manipulação desses tipos de genes pode resultar em atenuação ou perda completa da virulência de cepas de *Cryptococcus* spp. em modelos animais (PERFECT, 2006).

A cápsula mucopolissacarídica, composta por aproximadamente 90% de glucuronoxilomanana (GXM), 7% de galactoxilomanana (GalXM) e 3 % de manoproteínas, (MOYRAND et al., 2002), é considerada o principal fator de virulência do microrganismo, possibilitando seu melhor desempenho, tanto no ambiente quanto no hospedeiro (CASADEVALL; PERFECT, 1998; CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003). No meio ambiente, a cápsula pode proteger contra predadores, como nematóides e amebas (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL et al.,

2001). Enquanto isso, no hospedeiro, a cápsula dificulta a fagocitose ou promove a sobrevivência do microrganismo dentro de macrófagos (FELDMESSER; NOVIKOFF; CASADEVALL, 2000; TUCKER; CASADEVALL, 2002). A cápsula do *Cryptococcus* possui propriedades antifagocíticas e, durante o curso da infecção, os polissacarídeos capsulares são liberados, interferindo na resposta imune por meio de mecanismos distintos. Esses mecanismos variam desde alterações na regulação de citocinas a interferências na apresentação do antígeno (VECCHIARELLI, 2000; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; SOMMER; LIU; DOERING, 2003).

Vários genes estão envolvidos na síntese capsular e, pelo menos, quatro desses genes capsulares já foram identificados e caracterizados: *CAP59*, *CAP64*, *CAP60* e *CAP10* (KWON-CHUNG, 1998; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Diferenças significativas já foram observadas no curso da infecção pulmonar em murinos, quando mutantes acapsuladas foram complementadas com genes da região capsular (CHANG et al., 1997; BOSE et al., 2003; OKABAYASHI et al., 2005; OKABAYASHI; HASEGAWA; WATANABE, 2007).

A produção de melanina constitui outro fator de virulência importante relacionado ao fungo, pois possui ação antioxidante e antifagocítica (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; BOSE et al., 2003; MCFADDEN; DE JESUS; CASADEVALL, 2006). A melanina possui um radical livre estável, que é insolúvel nos solventes fisiológicos e resistente à degradação por ácidos. Desta maneira, protege o fungo dos radicais livres tóxicos que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). No final dos anos 1990, a lacase produzida por *C. neoformans* foi purificada e, em seguida, o gene relacionado a essa enzima, o *CNLAC1*, foi identificado e sequenciado (WILLAMSON, 1994; 1997). Desde então, vários estudos procuram compreender o verdadeiro papel da melanina na virulência do fungo.

A produção de melanina é realizada por uma fenoloxidase específica e o pigmento produzido fica localizado na parede celular do fungo, conferindo à célula efeito protetor contra reações oxidativas e radiação ultravioleta, bem como ataque às células de defesa (HAMILTON; HOLDON, 1999; BARLUZZI et al., 2000). Ademais, a habilidade do fungo de usar as catecolaminas, presentes em grandes quantidades no líquido, como substratos para a produção de melanina, explica, em parte, o forte tropismo de *C. neoformans* e *C. gattii* pelo SNC (CHANG et al., 2004).

Apesar de a virulência do complexo *C. neoformans* ser determinada, principalmente, pelos três fatores clássicos abordados, outros potenciais fatores de virulência são estudados, tais como a produção de urease e fosfolipases (STEENBERGER; CASDEVALL, 2003; OLSZEWSKI et al., 2004). Estudos realizados por Cox et al. (2000) mostraram que camundongos infectados com cepas mutantes de *C. neoformans* var. *grubii*, deficientes na produção de urease, apresentaram maior tempo de sobrevivência em relação aos infectados com o tipo selvagem. As fosfolipases se mostram capazes de hidrolisar cadeias de ésteres atuando na degradação e desestabilização da membrana celular do hospedeiro, ocasionando a lise da célula (COX et al., 2001).

Os fatores virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* são extensivamente descritos, contudo, nos últimos anos, um aumento no número de casos de criptococose por outras espécies conduz os pesquisadores a investigarem os fatores de virulência destas outras espécies, com destaque para o *C. laurentii* (CHENG et al., 2001). Apesar de, aparentemente, ser um fungo termossensível *in vitro* (IKEDA et al., 2002; MANFREDI et al., 2006), é capaz de produzir cápsula, cuja composição e estrutura são semelhantes àquela produzida por *C. neoformans* (SCHUTZBACH; ANKEL; BROCKHAUSEN, 2007). Recentemente, em uma revisão sobre a síntese do envelope glicoprotéico celular de *C. laurentii*, é possível verificar que este fungo é um excelente modelo para estudos acerca da síntese de glicoproteínas e polissacarídeos capsulares, que a ele podem conferir atributos patogênicos consideráveis (SCHUTZBACH; ANKEL; BROCKHAUSEN, 2007).

A existência de um sistema genético e fatores de virulência bem estabelecidos, aliada à disponibilidade de excelentes modelos animais, tornam o *Cryptococcus*, especialmente a espécie *C. neoformans*, um modelo atrativo para estudos de virulência fúngica (STEENBERGEN; CASDEVALL, 2003). A virulência, porém, é um fenótipo bastante complexo, quase sempre mantido como o resultado de uma seleção (CASDEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUNK, 2003). Logo, a origem e a manutenção da virulência em microrganismos habitantes do solo, tais como o *Cryptococcus*, ainda não estão completamente esclarecidas (LIN; HEITMAN, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma micose cosmopolita que assume papel relevante dentre as infecções fúngicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. É possível verificar, porém, que os principais agentes etiológicos da criptococose, especialmente *C. gattii*, estão cada vez mais associados a pacientes imunocompetentes, apresentando características de virulência importantes. Curiosamente, tipos moleculares e sorotipos atípicos foram relatados em surtos ou casos individuais da doença e, embora com menor frequência, outras espécies do gênero são implicadas em casos da doença, especialmente em animais.

Até o momento, poucos estudos sobre a criptococose são desenvolvidos na região Nordeste, em particular no Ceará, especialmente no que diz respeito às variedades, sorotipos e perfil *mating-type* dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. Logo, a carência de dados sobre a epidemiologia, bem como as vias de infecção da criptococose na região justificou o interesse pela busca de fontes naturais de infecção. Ademais, foi de grande importância a realização deste projeto de pesquisa, que visou a colaborar para o melhor entendimento da criptococose, com ênfase nos aspectos do perfil de sensibilidade a drogas antifúngicas e no diagnóstico molecular da doença.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- *Cryptococcus* spp. pode ser isolado dos gêneros vegetais *Azadirachta*, *Cassia*, *Eucalyptus*, *Mangifera*, *Psidium* e *Zizyphus*, na cidade de Fortaleza, Ceará.

- O fenômeno de resistência antifúngica primária está presente em isolados ambientais de *Cryptococcus* spp.

- A identificação de *Cryptococcus* spp. pelos métodos moleculares permite o diagnóstico mais completo do patógeno, com elevadas sensibilidade e especificidade de detecção.

- O perfil dos isolados de *Cryptococcus* spp. na região metropolitana de Fortaleza caracteriza-se pela predominância de *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A e *C. gattii* sorotipo B, bem como pela presença de cepas do tipo sexual α -mating-type.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo visou a contribuir para o melhor conhecimento dos aspectos fenotípicos e genotípicos de cepas de *Cryptococcus* spp. obtidas de origem ambiental e clínica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de *Cryptococcus* spp. em árvores dos gêneros *Azadirachta*, *Cassia*, *Eucalyptus*, *Mangifera*, *Psidium* e *Zizyphus*, na cidade de Fortaleza, Ceará.

- Investigar a resistência antifúngica primária, *in vitro*, das cepas ambientais de *Cryptococcus* spp. isoladas.

- Realizar um estudo comparativo entre métodos manuais, semiautomatizados, automatizados e PCR-REA na identificação de cepas de *Cryptococcus* spp. obtidos de origem ambiental e clínica.

- Determinar as variedades, sorotipos e *mating-type* das cepas ambientais e clínicas de *Cryptococcus* spp.

6 CAPÍTULO 1

Métodos Moleculares como Ferramentas Facilitadoras no Diagnóstico da Criptococose
– Uma Revisão

Molecular Methods to Facilitate Diagnosis of Cryptococcosis – A Review

Periódico: *Canadian Journal of Microbiology* (Submetido em novembro de 2009).

Resumo

Nos últimos anos, a criptococose e seus principais agentes etiológicos, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* ganharam grande destaque na comunidade médico-científica, principalmente pelo fato de a doença representar uma das principais micoses oportunistas em pacientes aids, além de estar cada vez mais relacionada com indivíduos hígidos, e os testes utilizados na identificação do microrganismo apresentarem limitações que podem dificultar o diagnóstico final. Atualmente, dispõe-se de sequências gênicas específicas para detecção do complexo *C. neoformans* em espécimes clínicos ou da cultura, embora não sejam empregadas no diagnóstico de rotina. Essas ferramentas moleculares possuem elevada especificidade e sensibilidade de detecção, com potencial para resolver limitações do diagnóstico convencional, podendo ser empregadas tanto na identificação como na tipagem e epidemiologia molecular do microrganismo. Este estudo realizou uma revisão de literatura acerca das principais técnicas moleculares que potencializam a identificação e tipagem dos principais agentes da criptococose.

Palavras-chave: Criptococose. Técnicas Moleculares. Diagnóstico. PCR. Tipagem.

Molecular methods to facilitate diagnosis of cryptococcosis – a review

Ana Karoline Freire Costa^a, José Júlio Costa Sidrim^b, Rossana Aguiar Cordeiro^{b,*},
Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^b, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco^a,
and Marcos Fábio Gadelha Rocha^{a,b}

^aFaculty of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700. CEP: 60.740-903, Fortaleza-CE, Brazil.

^bSpecialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo, s/n, Rodolfo Teófilo. CEP: 60430270, Fortaleza-CE, Brazil.

***Corresponding Author:** Rossana de Aguiar Cordeiro. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60425-540, Fortaleza, CE, Brazil. Phone/fax: 55 (85) 3295-1736. E-mail: rossanacordeiro@ufc.br

Abstract

In recent years, cryptococcosis and its main etiological agents, *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*, have gained great importance in the medical-scientific community because the disease not only represents one of the main opportunistic mycosis in HIV positive patients, it is increasingly affecting immunocompetent individuals as well. Additionally, the tests used to identify these microorganisms have limitations that make final diagnosis difficult. Currently there are molecular methods available to detect specific gene sequences of the *Cryptococcus neoformans* complex from clinical specimens and cultures, though they are not yet applied in routine diagnosis. These molecular tools have high detection sensitivity and specificity, with the potential to overcome the limitations of conventional diagnosis. They can be employed for identification and typing of microorganisms as well as for molecular epidemiology studies. The present study is a literature review of the main molecular techniques that have enhanced the identification and typing of the main agents of cryptococcosis.

Keywords: *Cryptococcus*, diagnosis, molecular methods

Introduction

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused primarily by fungi belonging to the *Cryptococcus neoformans* complex, whose members are *C. neoformans* and *C. gattii* (Bovers et al. 2008a). Based on specific antigens of the mucopolysaccharide capsule, subtyping data, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis, the *C. neoformans* complex is divided into *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and *C. gattii* (serotypes B and C). Serotype AD is frequently considered the fifth serotype of the complex. Other rare hybrid serotypes, occurring between *C. neoformans* and *C. gattii*, such as BD and AB, have been described (Katsu et al. 2004; Lin and Heitman 2006; Bovers et al. 2008b).

C. neoformans is cosmopolitan and the variety *grubii* is predominantly described in Europe, occurring in many environmental sources, such as accumulated bird excreta, especially from pigeons, as well as decomposing vegetal matter and tree hollows (Granados and Castañeda 2005; Kidd et al. 2007; Costa et al. 2009). *C. gattii* has been frequently described in association with *Eucalyptus* spp. trees, particularly in tropical and subtropical regions (Randhawa et al. 2003; Granados and Castañeda 2006). These species are capable of causing infection in humans and other animals, though *C. neoformans* occurs more frequently in immunocompromised individuals, causing a potentially fatal disease even when treated. *C. gattii*, on the other hand, has been primarily described in immunocompetent individuals (Duncan et al. 2006; Quazzafi et al. 2007; Wilbur and Heyborne 2009).

The prevailing laboratory investigation model for cryptococcosis is based on direct examination and isolation, followed by biochemical identification and immunodiagnosis. However, these tests have limitations that can hinder the final diagnoses (Huston and Mody 2009). Phenotypical tests, for example, are laborious, time

consuming and sometimes imprecise because of the subjectivity of interpreting the results (Wengenack and Binnicker 2009). Semi-automated and automated methods for yeast identification, such as API 20C AUX and VITEK, have allowed obtaining results within approximately 72 hours. However, these tests have their own limitations, since they depend on complementary tests for complete identification of the isolate (Gundes et al. 2001; Massonet et al. 2004). In immunological diagnosis, the occurrence of false positive results has been observed due to cross reactions with rheumatoid factors, *Trichosporon* spp. and Gram-negative rod contamination (Huston and Mody 2009).

Currently, although not applied in routine diagnosis, there are molecular methods available for the detection of specific gene sequences of the *Cryptococcus neoformans* complex from clinical specimens and cultures (Paschoal et al. 2004; Bovers et al. 2007). The molecular tools have high detection sensitivity and specificity, with the potential to overcome the limitations of conventional diagnosis, and they can be employed for identification, typing and molecular epidemiology studies (Magee et al. 2003; Leaw et al. 2006).

The present study is a literature review of the principal molecular techniques that have promoted advances in the identification and typing of the main agents of cryptococcosis.

Identification

Hybridization

The hybridization of nucleic acids, a technique based on the intrinsic complementarity property of nitrogen bases, was developed around 1975. It was one of the first methods applied in molecular studies of several pathogens (Sambrook et al.

1989). Thus, it was the first molecular test employed to identify *C. neoformans*, based on the recognition of specific gene regions (Spitzer and Spitzer 1992).

In the early 1990s, some important hybridization studies were carried out that involved the analysis of *C. neoformans* and *C. gattii*. Varma and Kwon-Chung (1992) developed a probe from genomic DNA, based on the sequence of repeated elements of the encoding gene for orotidine monophosphate pyrophosphorylase (*URA5*), to identify *C. neoformans*, named UT-4. It was able to hybridize to 12 to 14 chromosomes of the fungus. Spitzer and Spitzer (1992) built another probe, CNRE-I, based on the sequence of one repetitive and polymorphic DNA element, which hybridized at least seven chromosomes of the agent.

Since then, a variety of studies have been conducted to discover or improve more specific probes, to allow better differentiation of fungal varieties and testing on a greater number of isolates. Therefore, hybridization started to be performed associated with other techniques, such as Southern Blot, restriction fragment length polymorphism (RFLP) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

The PFGE and Southern Blot techniques associated with hybridization stand out, because they promoted advances in the study of the agents of cryptococcosis, with perspectives for diagnostic use (Herschleb et al. 2007). Southern Blot allows the identification of specific DNA fragments that have been separated in agarose gel, while PFGE allows the separation of high molecular weight fragments (chromosomes) through the placement of the samples in agarose gel, which is then submitted to a pulsed electric field (Herschleb et al. 2007). A pioneer work was that by Perfect et al. (1989), who used both techniques associated with hybridization to determine the characteristic restriction patterns of the four serotypes of *C. neoformans* and *C. gattii*. Another important study was by Polacheck et al. (1992), who applied hybridization associated

with Southern Blot to detect species-specific and variety-specific sequences of *C. neoformans* and *C. gattii*, through the use of probes based on the sequencing of repeated DNA elements.

For a long time hybridization, especially when combined with other techniques, was the most effective way to detect specific sequences of *C. neoformans* and *C. gattii*, since it has high sensitivity and specificity. However, it is a laborious and expensive, requiring many types of equipment. Therefore, with the emergence of new technologies allowing faster and more economical diagnosis of cryptococcosis, hybridization started to be used more in academic research, to determine varieties and genotypes of the fungus obtained from different geographic areas, or in combination with polymerase chain reaction (PCR) to confirm a specific amplification product, or also combined with analysis of a restriction pattern in comparative studies of genomic hybridization *in silico*, to obtain probes for drawing physical maps (Schein et al. 2002; Diaz and Fell 2005; Playford et al. 2006; Hu et al. 2008).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Among the several techniques to manipulate and obtain data from DNA, PCR, which arose in the late 1980s, enabled amplification of small and specific segments of the genome, permitting obtaining *in vitro* multiple copies of a specific region of the total DNA (Mullis et al. 1995; Sambrook et al. 1989). This technique has allowed advances in the diagnosis of cryptococcosis, with sufficiently high sensitivity and specificity to detect minimal amounts of the fungus. Besides this, it is faster, more easily executed and cheaper compared to hybridization. In addition, this technique can be applied to identify the fungus from contaminated samples and/or mixed cultures.

Nested PCR, multiplex PCR and Real-Time PCR have been the most used variant methodologies of PCR for identifying *C. neoformans* and *C. gattii*. Several target-sequences, which are described later in this review, have been applied to the identification of the *C. neoformans* complex, among which *URA5*, *CAP59*, M13 and ITS (18S, 5.8S and 28S) stand out (Table 1).

The ITS (internal transcribed spacer) region has been the one most often used to detect fungal sequences, especially due to its high degree of variation compared to other ribosomal DNA regions (e.g. SSU and LSU), and its existence in approximately 100 copies per haploid genome (Hsu et al. 2003). By using this region as a target for amplification in PCR, it has been possible to detect cryptococcosis caused by *C. neoformans* present in samples of cerebrospinal fluid (CSF) (Paschoal et al. 2004); *C. laurentii* isolated from oropharyngeal swabs (Bauters et al. 2001); *C. magnus* obtained from cat ear canal swabs (Kano et al. 2004), the first report of the fungus in this animal species; and *C. adeliensis* in mixed cultures (Leaw et al. 2006). The DNA sequencing technique, which has been used since late 1970s, is one of the main methods employed in association with PCR to confirm the identification of pathogenic fungi (Pryce et al. 2006; Quazzafi et al. 2007; Sambrook et al. 1989).

Another genetic target that has been frequently employed is the capsular region. Kano et al. (2001) detected *C. neoformans* from subcutaneous nodule biopsy samples from a cat infected with FeLV (feline leukemia virus). In this case, the identification was performed by amplifying the gene *CAP59*, which encodes capsule production. After sequencing and sequence alignment in specific software, the strains presented similarity of 99% with *C. neoformans* var. *neoformans*, serotype D.

Nested PCR

Among the most popular techniques for detecting *C. neoformans* and *C. gattii*, nested PCR, where the DNA used in the reaction is the product of previous amplification (Bialek et al. 2002), stands out. This technique is very useful, especially when there is a desire to increase detection sensitivity and specificity. As for other molecular methods, caution is required, especially concerning the presence of contaminants, since it is a very sensitive technique, over 100 times more sensitive than conventional PCR, and obtaining unspecific products is possible (Bialek et al. 2004). Nested PCR is more expensive than the conventional version, particularly because it requires more reagents, since it is performed in two phases with a different pair of primers for each phase.

An important advance in this area was the development of a nested PCR protocol for detection of *C. neoformans* and *C. gattii* from CSF of patients with neurocryptococcosis. The target chosen for amplification was the ITS region of ribosomal DNA (rDNA) and 100% of the samples analyzed were positive. The specificity and sensitivity of the technique were tested, the first by using DNA from other microorganisms, which did not amplify, and the latter by testing different dilutions of the fungus DNA samples, which provided amplification of only 10 fungal cells (Rappelli et al. 1998).

Another important contribution to the development of protocols involving nested PCR was a study using brain tissue samples from mice experimentally infected with *C. neoformans*, were used. The target employed during for the first reaction was the 18S region of the rDNA. For the second reaction, the chosen target region was the same, but the primers were specific for *C. neoformans*. From 100 samples analyzed, 86 amplified, which shows that the technique can be viable in the diagnosis of cryptococcosis (Bialek et al. 2002). More recently, in 2006 two cases of primary lymphonodular abdominal

cryptococcosis were reported where the diagnosis was established through nested PCR. In these cases, the employment of molecular tools was extremely important for diagnostic confirmation, since they were atypical clinical manifestations that led only to the suspicion of cryptococcosis due to the presence of capsulated cells on direct examination (Zou et al. 2006). Hence, nested PCR proved to be an alternative for rapid disease detection.

Multiplex PCR

Multiplex PCR allows the amplification of two or more loci in only one reaction and can be performed quickly with a smaller amount of DNA. This makes it another promising method for mycological diagnostic purposes. However, multiplex PCR can have some disadvantages compared to conventional PCR, such as lower detection sensitivity due to the need for higher initial concentration of the target sequences and the occurrence of polymorphism. Still, these factors can be associated with competition between primers for the target sequences and reagents present (Edwards et al. 1994; QIAGEN[®] Multiplex PCR Handbook 2008).

Multiplex PCR has been employed to detect important fungal species, such as *C. neoformans* from cultures, using as target-sequence the ITS region, specific primers for the *C. neoformans* complex and *Syber Green* dye (Luo and Mitchell 2002). Recently, a multiplex PCR protocol based on amplification of the ITS region with species-specific primers permitted rapid differentiation between *C. neoformans* and *C. gattii* from environmental and clinical isolates from humans and other animals. The chosen technique proved to be specific and sufficiently sensitive to be applied in laboratory routines (Leal et al. 2008). Other amplified regions have been shown to have sequences related to fungal aminotransferases and DNA polymerases (Horta et al. 2002; Casali et

al. 2003) Some studies have shown that the combination of certain primers can be employed to identify the *C. neoformans* complex. The simultaneous use of four primers for the amplification of the gene *LAC1*, which encodes lacase production, and two for the amplification of the capsular gene, *CAP64*, was successful in the serotype differentiation of *C. neoformans* and *C. gattii* isolates (Ito-Kuwa et al. 2007).

Real-Time PCR

Currently one of the most revolutionary methods for the diagnosis of pathogens is Real-Time PCR. This technique, which combines the chemistry of conventional PCR with adjustment to obtain much higher sensitivity levels, enables evaluating the number of molecules produced cycle by cycle (Vollmer et al. 2008). It is one of the most modern methods for rapid and precise identification of *C. neoformans* and *C. gattii* and it has allowed assessment of the gene expression level. However, Real-Time PCR requires expensive materials and specialized equipment (Amjad et al. 2004; Espy et al. 2006).

Bialek et al. (2002) employed Real-Time PCR as well as besides nested PCR for sample analysis. The former proved to be faster than the latter and provided quantitative results. Another interesting work was performed by Hsu et al. (2003), who with the goal of confirming the species from clinical isolates of *Cryptococcus* spp. and *Candida* spp. employed Real-Time PCR with species-specific primers. The method applied proved to be fast and highly sensitive and specific for pathogen detection.

Recently, Levy et al. (2008), through real-time PCR, were able to confirm the diagnosis of pericarditis caused by *C. neoformans*, by amplifying the genes 18S and 28S of rRNA. In this case, the method enabled the amplification from the culture medium as well as directly from the pericardiac fluid.

Typing

Molecular techniques for microorganism typing have allowed advances in classification and diagnosis, enhancing phylogenetic and epidemiological knowledge of determined certain etiological agents. The methods for genotyping the *C. neoformans* complex enable distinguishing among serotypes and molecular types of the fungus, according to the technique employed. However, typing must have high reproducibility. Not all molecular typing methods are equally discriminatory. PCR fingerprinting, RAPD, PCR-RFLP, AFLP and MLST are the most useful for the *C. neoformans* complex (Table 2).

PCR Fingerprinting and RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA)

One of the main advances in the 1990s with the development of molecular methods for *C. neoformans* complex typing was the discovery of the molecular markers based on PCR. The idea of using shorter primers based on arbitrary sequences in order to start amplification, eliminating the need to previously know the sequence, has enabled the differentiation of *C. neoformans* and *C. gattii* in serotypes, with enough sensitivity to detect inter- and intra-variety differences (Meyer et al. 1999; Frasés et al. 2009). As for identification, many target sequences have been used for typing *C. neoformans* and *C. gattii*, among them ITS rRNA and rDNA (18S, 5,8S and 28S) and *URA5*, *CNLAC1*, *CAP59*, *CAP64*, *PBL1*, M13, GACA₄.

PCR fingerprinting is considered one of the fastest molecular techniques for detecting band patterns (Mueller et al. 1999; Sun and Xu 2007; Ramos et al. 2008). The high homology obtained through the use of high annealing temperature between DNA-template and oligonucleotide primers has made it possible to obtain reliable and discriminatory results (Frasés et al. 2009). This type of technique needs to be well

established in each laboratory, contemplating the reaction conditions and equipment and material used in order to attain success and reproducibility for the test employed (Ngamwongsatit et al. 2005; Frasés et al. 2009).

PCR fingerprinting, which evaluates the pattern of polymorphic bands formed by DNA amplification with arbitrary sequence oligonucleotide primers, has enabled typing of the *C. neoformans* complex. One of the pioneer works in the area used oligonucleotide primers to amplify hypervariable DNA sequences of *C. neoformans* and *C. gattii* (Meyer et al. 1993). Since then, many studies have been performed to improve the technique to enable identification of the five serotypes of the *C. neoformans* complex (Chen et al. 1997). Besides serotype determination of the *C. neoformans* complex, PCR fingerprinting, together with other techniques, has made it possible to classify clinical and environmental isolates into eight molecular types, based on DNA polymorphic sequences observed by the presence of reproducible and specific bands: VNI (variety *grubii*, serotype A1), VNII (variety *grubii*, serotype A2), VNIII (serotype AD), VNIV (variety *neoformans*, serotype D), VGI, VGII, VGIII e VGIV (*C. gattii*, serotypes B and C). However, there still is no exact correlation between serotype and molecular type for *C. gattii* (Sorrell et al. 1996; Lin and Heitman 2006).

In one case of primary cutaneous cryptococcosis reported, besides conventional microbiological tests, the diagnosis was complemented by PCR fingerprinting, through the amplification of DNA microsatellite sequences to determine the molecular type involved. It was possible to observe that *C. neoformans* var. *neoformans*, serotype D, was the implicated species, the most prevalent in cases of cutaneous cryptococcosis, molecular type VNI (Hafner et al. 2005).

The true role of these molecular types and their correlation with clinical and environmental findings are yet to be studied (Sorrel 2001; Hoang et al. 2004). An

outbreak of cryptococcosis in Vancouver, Canada in 2004 showed how typing has been important for the understanding of the epidemiology and for the detection of the molecular type involved in that region. PCR fingerprinting was employed to determine the molecular type of *C. gattii* isolated from human (n=20) and animal (n=5) infections. It was observed that the great majority of the isolates belonged to molecular type VGII, which is considered the most virulent genotype for such species (Kidd et al. 2004). Some studies have been trying to determine whether there is a relationship between the clinical characteristics manifested, such as antifungal susceptibility, and the molecular type involved in the infection (Hafner et al. 2005). Once all the characteristics are determined, the studies will no longer be strictly epidemiological and the results obtained will provide useful information for the diagnosis and treatment of the disease (Sorrel 2001).

Another nomenclature commonly found to designate the technique described above is RAPD, which has enabled the differentiation among varieties, serotypes and molecular types of the *C. neoformans* complex (Sansinforiano et al. 2001; Litvintseva et al. 2005). By the early 1990s, RAPD had already been used to characterize microorganisms (Hadrys et al. 1992). With this idea, some studies were performed to adapt the technique to determine serotypes and molecular types of *C. neoformans* and *C. gattii* (Haynes et al. 1995; Ruma et al. 1996).

The use of arbitrary sequences of different primers allowed the identification of the molecular types involved in nine cases of human cryptococcosis in Northeastern Australia. Two isolates showed the VGI molecular type, while the other seven strains presented pattern VGII, diverging from other regions in Australia, where the predominant molecular type is VGI. This fact is probably related to the ecological niche found in the different regions studied (Chen et al. 1997). Besides this, the application of

the RAPD technique has aided in the determination of multiple strains involved in cases of cryptococcosis, as well as the identification of new strains responsible for reinfecting patients (Casadevall and Spitzer 1995).

An interesting study of RAPD resulted in the construction of a pair of primers for the differentiation of serotypes A and B of the *C. neoformans* complex. Through the analysis of the RAPD profile of 33 clinical strains of *C. neoformans*, oligonucleotide primers were developed based on specific sequences of the fungus which encodes aminotransferases and DNA polymerases (Aoki et al. 1999).

As observed, RAPD is a typing technique for the *C. neoformans* complex that can be used for different purposes, such as clinical and epidemiological studies (Garcia-Hermoso et al. 1999), as well as for more specific studies, like determination of the genetic profile of strains obtained from HIV-positive patients from a certain geographic region (Ngamwongsatit et al. 2005; Kang et al. 2009) or from different anatomical sites (Capoor et al. 2008).

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and MLST (Multilocus Sequence Typing)

PCR-RFLP and AFLP have proved to be specific techniques for rapid detection of serotypes and molecular types of the *C. neoformans* complex (Boekhout et al. 2001; Latouche et al. 2003). PCR-RFLP is very similar to RFLP, but, with the development even more specific primers, genomic DNA fragments are initially submitted to PCR and afterwards are cleaved with restriction enzymes, with no need of submitted them to hybridization (Nosanchuk et al. 2000; Panneerchelvam and Norazmi 2003).

Molecular epidemiology studies have shown that PCR-RFLP can be applied not only to determine a possible relationship among molecular types of clinical and

environmental isolates of the *C. neoformans* complex, but also for diagnostic purposes, with the target-sequence of the gene *URA5* one of the most used in the amplification reaction (Nosanchuk et al. 2000; Meyer et al. 2003; Kidd et al. 2004). Besides *URA5*, other targets have been employed for molecular typing associated with the use of restriction enzymes, such as the amplification of the capsular gene *CAP59* (Enanche-Angoulvant et al. 2007; Okabayashi et al. 2007). PCR-RFLP can be applied as a complementary test in the molecular diagnosis of cryptococcosis, using, for example, the PCR technique to identify the genus, followed by RFLP to determine the serotypes.

AFLP, which is one of the most advanced technologies for obtaining a great number of molecular markers distributed within prokaryotic and eukaryotic genomes, is another alternative for typing the *C. neoformans* complex (Bovers et al. 2008b). It essentially consists of four phases: genomic DNA cleavage with restriction enzymes; ligation of specific adapters to the sticky ends of the cleaved genomic fragments; amplification of a fraction of the segments generated by PCR with specific primers to recognize sequences in the adapter; and separation of the subset of amplified fragments through high resolution gel electrophoresis (Applied Biosystems 2007). AFLP is more efficient than PCR-RFLP because it combines high specificity, high resolution and high sampling power into one technique. Besides this, AFLP is excellent at detecting genetic variability, since it simultaneously explores the presence/absence of polymorphism of the restriction sites. Compared with RAPD, its specificity increases due to the use of longer primers in PCR cycles, which avoids the competition that occurs during the PCR phase of RAPD. Among the main limitations of AFLP are the greater number of phases involved in the procedure, the larger number of reagents and laboratory devices and the quality of the required DNA, which is a crucial factor for the technique's success (Mueller et al. 1999; Panneerchelvam and Norazmi 2003; Applied Biosystems 2007).

The AFLP method, besides grouping *C. neoformans* complex species in six molecular types, i.e., AFLP1, AFLP2, AFLP3, AFLP4, AFLP5, AFLP6 (Boekhout et al. 2001); has been used as an alternative molecular method capable of typing all five serotypes of the *C. neoformans* complex. Some studies have reported the use of AFLP for comparison of the results obtained through other typing technique. For serotyping, both methods normally are in agreement, with the exception of serotype AD, which has frequently been characterized as A or D through serotyping techniques and as AD through molecular techniques (Oliveira et al. 2004; Enanche-Angoulvant et al. 2007; Leal et al. 2008).

Among molecular typing techniques, MLST should be emphasized since it is an important source of global epidemiology and population structure studies (Enright and Spratt 1999). This methodology, which is based on the variation, observed at the nucleotide level, of DNA sequences of internal fragments of multiple loci of housekeeping genes, has been of great value for determining circulating genotypes of the *C. neoformans* complex in different parts of the world (Litvintseva et al. 2006; Chen et al. 2008; Himerath et al. 2008).

MLST has some advantages, especially the fact it is highly reproducible and unambiguous, besides the fact it can be performed *in silico*. In other words, after amplification and sequencing of the desired regions, the analysis done completely through specific computer programs that can be exchanged between laboratories. Moreover, the data generated can be used to differentiate isolates, investigate evolutionary relationships and suggest areas of study to the scientific, medical and veterinary communities (Maiden et al. 1998; Enright and Spratt 1999; Sullivan et al. 2006). However, in some countries this method can be considered expensive and can

also have strain differentiation restrictions due to the high degree of conservation of the housekeeping gene sequences chosen for analysis.

The MLST technique has been of great importance for molecular typing of the primary agents of cryptococcosis, and it has been particularly useful for understanding the epidemiology of the disease in some cases, such as the outbreak that occurred in Vancouver, where the dispersion of a more virulent and rarer *C. gattii* genotype, type VGIIa, was detected (Kidd et al. 2005). The methodology has already been described for typing of strains involved in isolated cases of the disease in humans and in other animals (MacDougall et al. 2007; Upton et al. 2007; Byrnes III et al. 2009a; Byrnes III et al. 2009b), as well as in studies concerning the population structure, reproduction means, dispersion and environmental recombination of *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) (Litvintseva et al. 2006; Feng et al. 2008; Hiremath et al. 2008; Chen et al. 2008).

Final considerations

The micromorphological characteristics of the organisms found in clinical specimens or in cultures, when carefully observed, can direct pathogen identification. However, the diagnosis of cryptococcosis is not always quickly and precisely established through these procedures. The perspective of using molecular methods to improve diagnosis and epidemiological monitoring of this mycosis, through the analysis of defined regions of the fungal genome present in clinical samples, has caused a rapid introduction of molecular techniques in the study of the disease, with perspectives and application to laboratory diagnosis.

Molecular tools have enabled the identification of infrequently described species, such as those of the *C. laurentii* complex, and offer more comprehensive results compared to conventional diagnosis, enhancing understanding of the epidemiology and

natural history of cryptococcosis. Furthermore, these techniques can be employed to monitor the presence and the establishment of genotypes, even the most virulent ones, in a given population, since they allow the study of environmental species diversity. Hence, the accumulation of data generated by molecular methods is having a positive impact on the monitoring of resistant strains and the treatment of diseases.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Specialized Medical Mycology Center (CEMM-Federal University of Ceará, Brazil) for providing the materials and facilities for this study and for excellent guidance given. This work was supported by the National Research Council (CNPq – 475724/2006-2).

References

- Amjad, M., Kfoury, N., Cha, R. and Mobarak, R. 2004. Quantification and assessment of viability of *Cryptococcus neoformans* by LightCycler amplification of capsule gene mRNA. *J. Med. Microbiol.* **53**: 1201-1206.
- Aoki, F.H., Imai, T., Tanaka, R., Mikami, Y., Taguchi, H., Nishimura, N.F., Nishimura, K., Miyaji, M., Schreiber, A.Z. and Branchini, M.L.M. 1999. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of Random Amplified Polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 315-20.
- Applied Biosystems. 2007. AFLP™ Microbial Fingerprinting Protocol.
- Bauters, T.G.M., Swinne, D., Boekhout, T., Noens, L. and Nelis, H.J. 2001. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. *Mycopathologia* **153**: 133-135.
- Bialek, R., Weiss, M., Bekure-Nemariam, K., Najvar, L.K., Alberdi, M.B., Graybill, J.R. and Reischl, U. 2002. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and Real-Time PCR assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 461-469.
- Bialek, R., Kern, J., Herrmann, T., Tijerina, R., Ceceñas, L., Reischl, U. and González, G.M. 2004. PCR Assays for Identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/Proline-Rich antigen. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 778-783.
- Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J.W., Hop, W.C.J., Abeln, E.C.A., Dromer, F. and Meyer, W. 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **147**: 891-907.

- Bovers, M., Diaz, M.R., Hagen, F., Spanjaard, L., Duim, B., Visser, C.E., Oogveld, H.L., Scharringa, J., Hoepelman, I.M., Fell, J.W. and Boekhout, T. 2007. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 1874-1883.
- Bovers, M., Hagen, F. and Boekhout, T. 2008a. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**: S4-S12.
- Bovers, M., Hagen, F., Kuramae, E.E., Hoogveld, H.L., Dromer, F., St-Germain, G. and Boekhout, T. 2008b. Aids patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* hybrid. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 1105-1108.
- Byrne III, E.J., Bildfell R.J., Dearing, P.L., Valentine, B.A. and Heitman, J. 2009a. *Cryptococcus gattii* with bimorphic colony types in a dog in western Oregon: additional evidence for expansion of the Vancouver Island outbreak. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**: 133-136.
- Byrnes III, E.J., Li. W., Lewit, Y., Perfect, J.R., Carter, D.A., Cox, G.M. and Heitman, J. 2009b. First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. *Plos One* **4**: 1-12.
- Capoor, M.R., Mandal, P., Deb, M., Aggarwal, P. and Banerjee, U. 2008. Current scenario of cryptococcosis and antifungal susceptibility pattern in India: a cause for reappraisal. *Mycoses* **51**: 258-265.
- Casadevall, A. and Spitzer, E.D. 1995. Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1682-1683.

- Casali, A.K., Goulart, L., Rosa e Silva, L.K., Ribeiro, A.M., Amaral, A.A., Alves, S.H., Schrank, A., Meyer, W. and Vainstein, M.H. 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. FEMS Yeast Res. **3**: 405-15.
- Chen, S.C.A., Currie, B.J., Campbell, H.M., Fisher, D.A., Pfeiffer, T.J., Ellis, D.H. and Sorrell, T.C. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in Northern Australia: existence of an environmental source other than known host *Eucalypts*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **91**: 547-550.
- Chen, J., Varma, A., Diaz, M.R., Litvintseva, A.P., Wollenberg, K.K. and Kwon-Chung, K.J. 2008. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerg. Infect. Dis. **14**: 755-62.
- Costa, A.K., Sidrim, J.J., Cordeiro, R.A., Brilhante, R.S.N., Monteiro, A.J. and Rocha, M.F. 2009. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. Mycopathologia. doi 10.1007/s11046-009-9245-1.
- Diaz, M.R. and Fell, J.W. 2005. Use of a Suspension Array for Rapid Identification of the Varieties and Genotypes of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. J. Clin Microbiol **43**: 3662-3672.
- Duncan, C., Stephen, C. and Campbell, J. 2006. Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. Can. Vet. J. **47**: 993-998.
- Edwards, M.C. and Gibbs, R.A. 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. Genome Res. **3**: S65-S75.

- Enanche-Angoulvant, A., Chandener, J., Symoens, F., Lacube, P., Bolognini, J., Douchet, C., Poirot, J.L. and Hennequin, C. 2007. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. J. Clin. Microbiol. **45**: 1261-1265.
- Enright, M.C. and Spratt, B.G. 1999. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol. **7**: 482-486.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill III, F.R. and Smith, T.F. 2006. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin. Microbiol. Rev. **19**: 165-256.
- Feng, X., Yao, Z., Ren, D., Liao, W. and Wu, J. 2008. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. FEMS Yeast Res. **8**: 930-938.
- Frasés, S., Ferrer, C., Sánchez, M. and Colom-Valiente, M.F. 2009. Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. Rev. Iberoam. Micol. **26**: 112-117.
- Garcia-Hermoso, D., Janbon, G. and Dromer, F. 1999. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. J. Clin. Microbiol. **37**: 3204-3209.
- Granados, D.P. and Castañeda, E. 2005. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. Microb. Ecol. **49**: 282-290.
- Granados, D.P. and Castañeda, E. 2006. 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. **6**: 636-644.

- Gundes, S.G., Gulenc, S. and Bingol, R. 2001. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C AUX systems in the identification of clinically significant yeasts. *J. Med. Microbiol.* **50**: 1105-1110.
- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**: 55-63.
- Hafner, C., Linde, H.J., Vogt, T., Breindl, G., Tintelnot, K., Koellner, K., Landthaler, M. and Szeimies, R.M. 2005. Primary cutaneous cryptococcosis and secondary antigenemia in a patient with long-term corticosteroid therapy. *Infection* **33**: 86-89.
- Haynes, K.A., Sullivan, D.J., Coleman, D.C., Clarke, J.C.K., Emilianus, R., Atkinson, C. and Cann, K.J. 1995. Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 99-102.
- Herschleb, J., Ananiev, G. and Schwartz, D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat. Protoc.* **2**: 677-84.
- Hiremath, S.S., Chowdhary, A., Kowshik, T., Randhawa, H.S., Sun, S. and Xu, J. 2008. Long-distance dispersal and recombination in environmental populations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from India. *Microbiology* **154**: 1513-1524.
- Hoang, L.M.N., Maguire, J.A., Doyle, P., Fyfe, M. and Roscoe, D.L. 2004. *Cryptococcal neoformans* infections at Vancouver hospital and health sciences center (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J. Med. Microbiol.* **53**:935-940.
- Horta, J.A., Staats, C.C., Casali, A.K., Ribeiro, A.M, Schrank, I.S., Schrank, A. and Vainstein, M.H. 2002. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Med. Mycol.* **40**: 565-71.

- Hsu, M.C., Chen, K.W., Lo, H.J., Chen, Y.C., Liao, M.H., Lin, Y.H. and Li, S.Y. 2003. Species identification of medically important fungi by use of Real-Time LightCycler PCR. *J. Med. Microbiol.* **52**: 1071-1076.
- Hu, G., Liu, I., Sham, A., Stajich, J.E., Dietrich, F.S. and Kronstad, J.W. 2008. Comparative hybridization reveals extensive genome variation in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Biol.* **9**: R41.
- Huston, S.M. and Mody, C.H. 2009. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clin. Chest. Med.* **30**: 253-264.
- Ito-Kuwa, S., Nakamura, K., Aoki, S. and Vidotto, V. 2007. Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Mycoses* **50**: 277-281.
- Kang, Y., Tanaka, H., Moretti, M.L. and Mikami, Y. 2009. New ITS genotype of *Cryptococcus gattii* isolated from an AIDS patient in Brazil. *Microbiol. Immunol.* **53**: 112-116.
- Kano, R., Fujino, Y., Takamoto, N., Tsujimoto, H. and Hasegawa, A. 2001. PCR detection of the *Cryptococcus neoformans* CAP59 gene from a biopsy specimen from a case of feline cryptococcosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* **13**: 439-442.
- Kano, R., Hosaka, S. and Hasegawa, A. 2004. First isolation of *Cryptococcus magnus* from a cat. *Mycopathologia* **157**: 263-264.
- Katsu, M., Kidd, S., Ando, A., Moretti-Branchini, M.L., Mikami, Y., Nishimura, K. and Meyer, W. 2004. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Res.* **4**: 377-388.
- Kidd, S.E., Hagen, F., Tschärke, R.L., Huynh, M., Bartlett, K.H., Fyfe, M., Macdougall, L., Boekhout, T., Kwon-Chung, K.J. and Meyer, W. 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 17258-17263.

- Kidd, S.E., Guo, H., Bartlett, K.H., Xu, J. and Kronstad, J.W. 2005. Comparative gene genealogies indicate that two clonal lineages of *Cryptococcus gattii* in British Columbia resemble strains from other geographical areas. *Eukaryot. Cell* **4**: 1629-1638.
- Kidd, S.E., Chow, Y., Mak, S., Bach, P.J., Chen, H., Hingston, A.O., Kronstad, J.W. and Bartlett, K.H. 2007. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1433-1443.
- Latouche, G.N., Huynh, M., Sorrell, T.C. and Meyer, W. 2003. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Phospholipase B (*PLBI*) Gene for Subtyping of *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2080-2086.
- Leal, A.L., Faganello, J., Bassanesi, M.C. and, Vainstein M.H. 2008. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Med. Mycol.* **46**: 377-383.
- Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J. and Chang, T.C. 2006. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 693-699.
- Levy, P.Y., Habib, G., Reynaud-Gaubert, M., Raoult, D. and Rolain, J.M. 2008. Pericardial effusion due to *Cryptococcus neoformans* in a patient with cystic fibrosis following lung transplantation. *Int. J. Infect. Dis.* **12**: 452.
- Lin, X. and Heitman, J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* **8**: 69-105.
- Litvintseva, A.P., Kestenbaum, L., Vilgalys, R. and Mitchell T.G. 2005. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 556-564.

- Litvintseva, A.P., Thakur, R., Vilgalys, R. and Mitchell, T.G. 2006. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* **172**: 2223-2238.
- Luo, G. and Mitchell, T.G. 2002. Rapid Identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2860-2865.
- MacDougall, L., Kidd, S.E., Galanis, E., Mak, S., Leslie, M.J., Cieslak, P.R., Kronstad, J.W., Morshed, M.G. and Bartlett, K.H. 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg. Infect. Dis* **13**: 42-50.
- Magee, P.T., Gale, C., Berman, J. and Davis, D. 2003. Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infect. Immun.* **71**: 2299-2309.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. and Spratt, B.G. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 3140-3145.
- Massonet, C., Eldere, J.V., Vaneechoutte, M., Baere, T., Verhaegen, J. and Lagrou, K. 2004. Comparison of VITEK 2 with ITS2-Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Yeast Species. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 2209-2211.
- Meyer, W., Mitchell, T.G., Freedman, E.Z. and Vilgalys, R. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2274-2280.
- Meyer, W., Marszewska, K., Amirmostofian, M., Igreja, R.P., Hardtke, C., Methling, K., Viviani, M.A., Chindamporn, A., Sukroongreung, S., John, M.A., Ellis, D.H. and Sorrell, T.C. 1999. 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* **20**: 1790-1799.
- Meyer, W., Castañeda, A., Jackson, S., Huynh, M. and Castañeda, E. 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 189-195.
- Mueller, U.G. and Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* **14**: 389-394.
- Mullis, K.B., Ferré, F. and Gibbs, R.A. 1995. PCR - The polymerase chain reaction. *TIG* **11**: 249.
- Ngamwongsatit, P., Sukroongreung, S., Nilakul, C., Prachayasittikul, V. and Tantimavanich, S. 2005. Electrophoretic karyotypes of *Cryptococcus neoformans* serotype A recovered from Thai patients with AIDS. *Mycopathologia* **159**: 189-197.
- Nosanchuk, J.D., Shoham, S., Fries, B.C., Shapiro, D.S., Levitz, S.M. and Casadevall, A. 2000. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann. Intern. Med.* **132**: 205-208.
- Okabayashi, K., Hasegawa, A. and Watanabe, T. 2007. Microreview: capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **163**:1-8.
- Oliveira, M.T.B., Boekhout, T., Theelen, B., Hagen, F., Baroni, F.A., Lazéra, M.S, Lengeler, K.B., Heitman, J., Rivera, I.N.G. and Paula, C.R. 2004. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1356-1359.
- Panneerchelvam, S. and Norazmi, M.N. 2003. Forensic DNA profiling and database. *Malays. J. Med. Sci.* **10**: 20-26.
- Paschoal, R.C., Hirata, M.H., Hirata, R.C., Melhem, M.S.C., Dias, A.L.T. and Paula, C.R. 2004. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **46**: 203-207.

- Perfect, J.R., Magee, B.B. and Magee, P.T. 1989. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. *Infect. Immun.* **57**: 2624-262.
- Playford, E.G., Kong, F., Sun, Y., Wang, H., Halliday, C. and Sorrell, T.C. 2006. Simultaneous Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* Species by Reverse Line Blot Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 876-880.
- Polacheck, I., Lebens, L.G. and Hicks, J.B. 1992. Development of DNA probes for early diagnosis and epidemiological study of cryptococcosis in aids patients. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 925-930.
- Pryce, T.M., Palladino, S., Price, D.M., Gardam, D.J., Campbell, P.B., Christiansen, K.J. and Murray, R.J. 2006. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/ALERT, BACTEC, and BBL MGIT media using polymerase chain reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **54**: 289-297.
- Quazzafi, Z., Thiruchunapalli, D., Birkenhead, D., Bell, D. and Sandoe, J.A.T. 2007. Invasive *Cryptococcus neoformans* infection in an asplenic patient. *J. Infect.* **55**: 566-568.
- QIAGEN[®] Multiplex PCR Handbook. 2008. For fast and efficient multiplex PCR without optimization.
- Ramos, J.R., Telles, M.P.C., Diniz-Filho, J.A.F., Soares, T.N., Melo, D.B. and Oliveira, G. 2008. Optimizing reproducibility evaluation for random amplified polymorphic DNA markers. *Genet. Mol. Res.* **7**: 1384-1391.
- Randhawa, H.S., Kowshik, T. and Khan, Z.U. 2003. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* **41**: 189-197.

- Rappelli, P., Are, R., Casu, G., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P. and Aceti, A. 1998. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. **36**: 3438-3440.
- Ruma, P., Chen, S.C.A, Sorrel, T.C. and Brownlee, A.G. 1996. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. Lett. Appl. Microbiol. **23**: 312-316.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sansinforiano, M.E., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Parejo, J.C., Hermoso de Mendoza, M. and Padilla, J.A. 2001. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. Rev. Iberoam. Micol. **18**: 65-69.
- Schein, J.E., Tangen, K.L., Chiu, R., Shin, H., Lengeler, K.B., MacDonald, W.K., Bosdet, I., Heitman, J., Jones, S.J.M., Marra, M.A. and Kronstad, J.W. 2002. Physical maps for genome analysis of serotype A and D strains of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Genome Res. **12**: 1445-1453.
- Sorrell, T.C., Chen, S.C., Ruma, P., Meyer, W., Pfeiffer, T.J., Ellis, D.H. and Brownlee, A.G. 1996. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J. Clin. Microbiol. **34**: 1253-1260.
- Sorrell, T.C. 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med. Mycol. **39**: 155-68.
- Spitzer, E.D. and Spitzer, S.G. 1992. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. **30**: 1094-1097.
- Sullivan, C.B., Jefferies, J.M.C., Diggle, M.A. and Clarke, S.C. 2006. Automation of MLST using third-generation liquid-handling technology. Mol. Biotechnol. **32**: 219-225.

- Sun, S. and Xu, J. 2007. Genetic analyses of a hybrid cross between serotypes A and D strains of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* **177**: 1475-1486.
- Upton, A., Fraser, J.A., Kidd, S.E., Bretz, C., Bartlett, K.H., Heitman, J. and Marr, K.A. 2007. First contemporary case of human infection with *Cryptococcus gattii* in Puget Sound: evidence for spread of the Vancouver Island outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3086-3088.
- Varma, A. and Kwon-Chung, K.J. 1992. DNA Probe for Strain Typing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2960-2967.
- Vollmer, T., Störmer, M., Kleesiek, K. and Dreier, J. 2008. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 1919-1926.
- Wengenack, N.L. and Binnicker, M.J. 2009. Fungal molecular diagnostics. *Clin. Chest. Med.* **30**: 391-408.
- Wilbur, L. and Heyborne, R. 2009. Transient loss of consciousness caused by cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient: a case report. *Cases J.* **2**: 60.
- Zou, C.C., Yu, Z.S., Tang, L.F., Liang, L. and Zhao, Z.Y. 2006. Primary abdominal lymphonodular cryptococcosis in children: 2 case reports and a literature review. *J. Pediatr. Surg.* **41**: E11-E15.

Table 1. Main molecular techniques and specific targets used for the identification of *C. neoformans* and *C. gattii*.

	Technique	Targets	Advantages	Disadvantages	Reference
Identification	Hybridization	Repetitive and polymorphic DNA	High sensitivity and specificity.	Expensive and laborious.	Sitzer and Spitzer, 1992
	PCR	ITS and 5,6S rRNA	High sensitivity and specificity; quickness and feasibility.	Presence of contaminants in extraction and reaction phases.	Paschoal et al., 2004
	<i>Nested</i> PCR	ITS rDNA	High sensitivity and specificity.	Presence of contaminants in reaction.	Rapelli et al., 1998
	Multiplex	Serotype specific	Amplification of two or more loci in only one reaction; small amounts of extracted DNA.	Interference due to the presence of polymorphism; reagent competition; possible nonspecific products.	Leal et al., 2008
	Real-Time PCR	18S/28 rRNA	High sensitivity and specificity; detection of gene expression levels; quickness.	Interference in the final analyze due to contamination with genomic DNA; requires technical ability and support; expensive.	Levy et al., 2008
Typing	PCR fingerprinting	Microsatellite (GACA) ₄	Previous knowledge of target-sequences isn't necessary; use of short primers; polymorphism detection.	Standardization of the technique according to the conditions of each laboratory.	Hafner et al., 2005
	RAPD	Minisatellite (M13)	Previous knowledge of target-sequences isn't necessary; use of short primers; polymorphism detection.	Standardization of the technique according to the conditions of each laboratory.	Capoor et al., 2008
	PCR-RFLP	Urease	Specificity; hybridization phase can be skipped.	Decreased sensitivity in case of isolated mutations.	Meyer et al., 2003
	AFLP	Capsule	High sensitivity and specificity; high resolution and sampling power; detection of genetic variability.	Greater number of phases, larger number of reagents, expensive.	Enanche-Angoulvant et al., 2007
	MLST	IGS, capsule, laccase, urease, phospholipase	Reproducible and unambiguous; completely automated analysis, simultaneous analysis of multiple loci.	Limitations in the differentiation of strains when genes are very conserved.	Chen et al., 2008

Table 2. Genotyping methods and information retrieved for *C. neoformans complex* species.

Method/Target	Primers (5' - 3')	Reaction	Typing information acquired	Reference
Fingerprinting/M13	GAGGGTGGCGGTTCT	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94 °C, 20 s; 50°C, 1 min; 72°C, 20 s (35 cycles); 2. Final extension cycle for 6 min at 72 °C. 	Grouped <i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i> strains into eight previously established molecular types: VNI, VNII, VNIII; VNIV, VGI, VGII, VGIII, VGIV.	Meyer e al., 2003
RAPD/ITS	ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Initial denaturation at 94 °C, 2 min; 2. 94 °C, 45 s; 61 °C, 1 min ; 72 °C, 2 min (35 cycles); 3. Final extension cycle at 72 °C, 10 min 	Recent classification of a new <i>C. gattii</i> genotype: ITS type 8.	Kang et al., 2009
Sequencing/ ITS1-5.8S-ITS1	ATTGCGTCCA ATGGATCGGC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Initial denaturation at 94 °C, 4 min; 2. 94 °C, 2 min; 32 °C, 2 min ; 72 °C, 2 min (35 cycles); 3. Final extension cycle at 72 °C, 10 min 		
PCR-RFLP/ <i>CAP59</i>	CCTTGCCGAAGTTCGAAACG AATCGGTGGTTGGATTCAAGTGT	<ol style="list-style-type: none"> 1. Initial denaturation at 94 °C, 7 min; 2. 94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s (3 cycles); 3. 94 °C, 30 s, 58 °C, 30 s, 72 °C, 30 s (3 cycles); 4. 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s (3 cycles); 5. 94 °C, 30 s, 52 °C, 30 s, 72 °C, 30 s (28 cycles); 6. Final extension at 72 °C, 15 min. <p>First reaction:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 72 °C, 2 min; 2. 94 °C (20 cycles), 20 s; 3. 56 °C, 30 s; 4. 72 °C; 2 min <p>Second reaction:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 94 °C, 2 min; 2. 20 s at 94 °C, 20 s, 66 °C, 30 s (10 cycles and decreasing 1 °C every step of the cycle); 3. 72 °C, 2 min; 4. 94 °C, 20 s, 56 °C, 30 s (25 cycles); 5. 72 °C, 2 min. 	Identification of <i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i> serotypes: A, B, C, D, AD.	Enanche-Angoulvant et al., 2007
AFLP/ <i>EcoRI</i> and <i>MseI</i>	First reaction: <i>EcoRI</i> and <i>MseI</i> core sequences; Second reaction: <i>EcoRI</i> -AC FAM and <i>MseI</i> -G	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94 °C, 2 min; 2. 20 s at 94 °C, 20 s, 66 °C, 30 s (10 cycles and decreasing 1 °C every step of the cycle); 3. 72 °C, 2 min; 4. 94 °C, 20 s, 56 °C, 30 s (25 cycles); 5. 72 °C, 2 min. 	Grouped <i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i> isolates into six genotypes: AFLP1, AFLP2, AFLP3, AFLP4, AFLP5, AFLP6.	Boekhout et al., 2001

7 CAPÍTULO 2

Pombos Urbanos (*Columba Livia*) como Potencial Fonte de Leveduras Patogênicas: Enfoque na Susceptibilidade Antifúngica das Cepas de *Cryptococcus* no Nordeste do Brasil

Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Potential Source of Pathogenic Yeasts: A Focus on Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus* Strains in Northeast Brazil

Periódico: *Mycopathologia* (Aceito em setembro de 2009).

Resumo

Com o propósito de investigar os pombos como uma potencial fonte de leveduras patogênicas, 47 amostras de excrementos de pombos e 322 amostras obtidas da cloaca desses animais foram avaliadas. Além disso, foram coletadas amostras de árvores localizadas próximas aos ambientes onde se encontravam os pombos, na cidade de Fortaleza, Ceará, Nordeste do Brasil. Além disso, avaliou-se a sensibilidade *in vitro* das cepas ambientais de *Cryptococcus* spp. ante a anfotericina B, azólicos e caspofungina. *C. neoformans* var. *neoformans* ($n = 10$), *C. laurentii* ($n = 3$), *Candida* spp. ($n = 14$), *Rhodotorula mucilaginosa* ($n = 6$) e *Trichosporon* sp. ($n = 3$) foram isoladas dos excrementos de pombos. Em contraste, somente *Candida* spp. ($n = 4$), *Trichosporon* sp. ($n = 3$) e *R. mucilaginosa* ($n = 2$) foram recuperadas de espécimes da cloaca. Somente *C. glabrata* foi isolada das amostras de plantas. Resistência aos azólicos foi detectada em apenas uma cepa ambiental de *Cryptococcus*, a qual foi resistente para itraconazol (CIM=1 $\mu\text{g/mL}$). Como esperado, todas as cepas de *Cryptococcus* foram resistentes à caspofungina. Em suma, este estudo confirmou que pombos urbanos constituem potencial fonte de *Cryptococcus* spp. e outras leveduras patogênicas. Ademais, resistência antifúngica foi observada em somente uma cepa ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* no Nordeste do Brasil.

Palavras-chave: Pigeons. Árvores. Leveduras. *Cryptococcus*. Susceptibilidade Antifúngica.

Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Potential Source of Pathogenic Yeasts: A Focus on Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus* Strains in Northeast Brazil

Ana K. F. Costa · José J. C. Sidrim ·
Rossana A. Cordeiro · Raimunda S. N. Brilhante ·
André J. Monteiro · Marcos F. G. Rocha

Received: 15 January 2009 / Accepted: 29 September 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract To investigate pigeons as a potential source of pathogenic yeast species, 47 samples of pigeon droppings and 322 samples from pigeon cloacae were evaluated. The samples were also collected from trees located near the pigeon habitats, in the city of Fortaleza, Ceará, Northeast Brazil. In addition, we evaluated the *in vitro* antifungal susceptibility of these environmental *Cryptococcus* strains to amphotericin B, azoles and caspofungin. *C. neoformans* var. *neoformans* ($n = 10$), *C. laurentii* ($n = 3$), *Candida* spp. ($n = 14$), *Rhodotorula mucilaginosa* ($n = 6$) and *Trichosporon* sp. ($n = 3$) were isolated from pigeon droppings. In contrast, only *Candida* spp. ($n = 4$), *Trichosporon* sp. ($n = 3$) and

R. mucilaginosa ($n = 2$) were recovered from cloacae specimens. Only *Candida glabrata* ($n = 1$) was recovered from plant samples. Azole resistance was detected in only one environmental strain of *Cryptococcus*, which was resistant to itraconazole (MIC = 1 µg/ml). As expected, all *Cryptococcus* strains were resistant to caspofungin. In summary, the present study confirms that urban pigeons are a potential source of *Cryptococcus* spp. and other pathogenic yeasts. Additionally, antifungal resistance was observed in one environmental strain of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Northeast Brazil.

Keywords Pigeons · Trees · Yeasts · *Cryptococcus* · Antifungal susceptibility

A. K. F. Costa · M. F. G. Rocha
Faculty of Veterinary Medicine, Postgraduate Program
in Veterinary Science, State University of Ceará, Av.
Pantufre, 1700, Fortaleza, CE 60740-903, Brazil

J. J. C. Sidrim · R. A. Cordeiro · R. S. N. Brilhante ·
M. F. G. Rocha
Specialized Medical Mycology Center, Federal University
of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo, s/n, Rodolfo
Teófilo, Fortaleza, CE 60430270, Brazil

A. J. Monteiro
Department of Statistics, Federal University of Ceará,
Campus do Pici, s/n, Fortaleza, CE 60455-14760, Brazil

R. A. Cordeiro (✉)
Rua Barão de Carindé, 210, Montese, Fortaleza,
CE 60425-540, Brazil
e-mail: ross@uece.br

Introduction

Domestic and wild birds are known to be possible carriers of fungi that are pathogenic to humans and other animals [5, 15]. In particular, several studies have been carried out on the occurrence of *C. neoformans* in bird droppings in psittaciformes [1, 24], passeriformes, columbiformes [1] and falconiformes [4]. *C. neoformans* and *C. gattii* are basidiomycetous capsulate yeasts that can cause cryptococcosis, an opportunistic life-threatening illness that usually manifests itself as meningoencephalitis, mainly in

immunocompromised patients [21]. The disease also occurs in both wild and domestic animals [5, 10, 17].

In addition to *C. neoformans* and *C. gattii*, other *Cryptococcus* species with pathogenic potential have been found in birds, especially *C. albidus*, *C. laurentii* and *C. uniguttulatus* [6, 34]. Besides *Cryptococcus* species, others pathogenic yeasts, such as *Candida* spp. and *Trichosporon* spp., have also been found to be carried by domestic and wild birds [5, 15].

Opportunistic fungal infections resistant to antifungal agents have been increasingly documented in recent years, and their frequency will likely continue to increase. *Candida* spp. and *C. neoformans* are among the fungi responsible for these mycoses. While antifungal resistance to each of these fungi has been described, especially to *Candida* [2, 8], resistance among *Cryptococcus* spp. needs more investigation [34].

In recent years, clinical evidence has indicated that cryptococcosis is an important infection in Brazil [26]. However, to date, little is known on natural sources of infection in Northeast Brazil, a semiarid region. Therefore, our main aim was to investigate the occurrence of *Cryptococcus* spp. and other yeasts in the cloacae and feces of pigeons as well as in trees near their habitats. Additionally, we evaluated the *in vitro* antifungal susceptibility profile of environmental *Cryptococcus* strains.

Materials and Methods

Pigeon Dropping Procedures

Forty-seven samples of desiccated pigeon droppings were collected in open-air public spaces in the city of Fortaleza, Brazil (3°30' and 4°30'S and 38°39' WGR) from August 2006 to March 2007. The city is situated in the Northeast region of Brazil, which is characterized by warm average temperatures and low rainfall levels. The city has an average temperature of 26–28°C, with a rainy season occurring between January and May and average yearly rainfall of 1,338 mm. The geographic data were provided by the Ceará State Research and Economic Strategy Institute (*Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará—IPECE*).

The samples were collected according to the method described by Filiú et al. [14]. After

homogenization with sterile saline solution (NaCl 0.9%) and rest for 30 min at 25°C, the supernatant was aspirated and 0.1 ml was distributed in Petri dishes containing niger seed agar medium (NSA), supplemented with 0.2 g/l of chloramphenicol, and in Petri dishes containing minimal synthetic caffeic acid medium (MSCAM) [36]. The samples were smeared in duplicate, incubated at 28°C and inspected daily until yeast-like colonies were observed.

Cloaca Specimen Procedures

The material was collected from cloacae swabs from 322 pigeons captured between August 2006 and January 2007. The birds were randomly sampled from six pigeon lofts and two pet shops. Sterile cotton swabs were introduced and rotated in the cloaca of each pigeon and then kept at 8°C in sterile saline solution until processing in the laboratory. Then, they were inoculated in Petri dishes containing NSA (glucose 15.0 g/l; creatinine 5.0 g/l; KH₂PO₄ 3.0 g/l; biphenyl 1.0 g/l) supplemented with 0.2 g/l of chloramphenicol, to avoid bacterial contamination, and in Petri dishes with MSCA [36]. The dishes were incubated at 25°C and inspected daily for 10 days.

Plant Material Procedures

After determining which pigeon dropping samples were positive for *C. neoformans*, we collected tree matter samples from 50 trees near where the *C. neoformans*-yielding pigeon samples had been collected. The trees belonged to the following species: *Psidium guajava* ($n = 11$), *Mangifera indica* ($n = 2$), *Eucalyptus* sp. ($n = 8$), *Cassia siamea* ($n = 5$), *Zizyphus joazeiro* ($n = 10$) and *Azadirachta indica* ($n = 14$). Seventy samples of plant matter were used, of which 57 came from the trunks and 13 from hollows. The samples from the tree trunks and hollows were scraped with a spatula [28], placed in sterile plastic bags and immediately taken to the Specialized Medical Mycology Center (CEMM) for processing. About 5 g of each sample was suspended in 45 ml of saline solution (NaCl 0.9%) containing 0.05 mg/ml of chloramphenicol, stirred for 10 min and then left at rest for approximately 1 h. Then 0.1-ml aliquots of the supernatant were distributed in Petri dishes, in duplicate, containing NSA medium. The plates were incubated at

28°C and the growth of the fungal colonies was observed for up to 10 days.

Identification of *Cryptococcus* sp.

The dark-brown or black yeast-like colonies suspected to be *Cryptococcus* spp. from NSA and MSCAM plates were subcultured in Petri dishes containing NSA, and then cultured in 2% Sabouraud dextrose agar and incubated at 25°C for species identification. Afterward, fragments of the colonies were examined by microscope (40×) for morphological analysis, after staining with a solution of lactophenol cotton blue. When round, regular size, single or multiple budding yeasts without hyphae or pseudo-hyphae were observed, we conducted the urease production analysis on Christensen's urea agar, observed after 24–48 h. The color change of the medium from yellow to pink was deemed to indicate a positive reaction. *C. neoformans* biotyping was carried out by the canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) agar growth test, as described by Kwon-Chung et al. [16]. Additionally, *Cryptococcus* identification was carried out by API 20C AUX (BioMérieux, France), according to the manufacturer's instructions. To confirm the *Cryptococcus* identification, the strains previously identified by NSA growth, CGB medium and API 20C were submitted to a specific PCR, based on the amplification of a fragment of the *CAP59* gene required for capsule biosynthesis [12]. The DNA was extracted using CTAB followed by chloroform/isoamyl alcohol extraction [3]. The PCRs were carried out as previously described [12]. The PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gel (2% in Tris-borate-EDTA buffer) at 90 V, for 3 h, followed by staining with ethidium bromide (0.5 mg/ml).

Identification of Other Fungal Species

The identification of *Candida* species was based on micromorphological analysis on cornmeal-Tween 80 agar, API 20C AUX (BioMérieux, France) and growth in CHROMagar-Candida[®] (Paris, France) [27]. The *Trichosporon* spp. identification was based on macromorphology characteristics in 2% Sabouraud dextrose agar, slide cultures on malt extract agar and assimilation of carbohydrates [9]. Finally, the *Rhodotorula* spp. identification was based on

macromorphologic characteristics in malt extract agar, assimilation of carbohydrates and urease production, as previously described [9].

Antifungal Susceptibility Tests

The antifungal susceptibility profile of *Cryptococcus* spp. strains from environmental sources was evaluated by the broth microdilution method, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [7]. *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6528 were included as quality controls. Stock solutions of amphotericin B (Sigma Chemical Corporation, USA), voriconazole (Pfizer Pharmaceuticals, USA), itraconazole and ketoconazole (Janssen Pharmaceutica, Belgium) were prepared in dimethyl sulfoxide; fluconazole (Pfizer Pharmaceuticals, USA) and caspofungin (Merck Sharp & Dohme, Brazil) were prepared in distilled water. All solutions were stored at –80°C until use. Serial two-fold dilutions of each antifungal agent were prepared with RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., USA), with L-glutamine and without sodium bicarbonate, and buffered to pH 7.0 with 0.165 M MOPS (morpholino-propanesulfonic acid). The final concentrations ranged as follows: 0.01 and 16 µg/ml for amphotericin B, voriconazole, itraconazole and ketoconazole and caspofungin; and 0.06–64 µg/ml for fluconazole. The microdilution assay was performed in 96-well microdilution plates. Positive growth controls and wells with sterile media alone were used for each analysis. The microplates were incubated at 37°C and were read visually after 2 days. All isolates were run in duplicate and repeated at least twice. For azoles and caspofungin, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest drug concentration showing 80% inhibition of fungal growth. For amphotericin B, the MIC was considered to be the lowest concentration of the drug at which there was no fungal growth, as recommended by CLSI-M27A2. Resistance was defined as MIC ≥ 2 µg/ml against amphotericin B and ketoconazole; MIC ≥ 8 µg/ml for caspofungin; MIC ≥ 1 µg/ml for itraconazole and voriconazole and MIC ≥ 64 µg/ml for fluconazole [13, 34].

Statistical Analysis

The study was conducted utilizing descriptive variable analysis. The Fisher and Pearson Chi-square

tests were used to analyze the associations of the categorized variables. The Mann-Whitney nonparametric test was used for the comparison analysis between the discrete data. The smallest significance level considered in all the tests was 0.05.

Results

From the 47 samples of pigeon droppings, 13 were positive for *Cryptococcus* spp. (Table 1). By way of the API 20AUX system and CGB test, the *Cryptococcus* species from pigeon droppings were identified as *C. neoformans* var. *neoformans* ($n = 10$; $P < 0.05$) and *C. laurentii* ($n = 3$). The identification of *C. neoformans* from environmental sources was confirmed by PCR.

In addition to *Cryptococcus* species, *C. albicans* ($n = 9$; $P < 0.05$), *C. tropicalis* ($n = 3$), *C. krusei* ($n = 1$), *C. parapsilosis* ($n = 1$), *R. mucilaginosa* ($n = 6$) and *Trichosporon* sp. ($n = 3$) were also isolated from the pigeon droppings (Table 1).

With respect to the cloacae specimens, of 322 samples collected, no *Cryptococcus* were isolated. However, other yeasts were found, as follows: *C. albicans* ($n = 3$), *C. tropicalis* ($n = 1$), *Rhodotorula* sp. ($n = 2$) and *Trichosporon* sp. ($n = 3$) (Table 1).

From the seventy plant matter samples collected, only one yeast species was isolated (identified as *C. glabrata*), from a *Eucalyptus* sp. trunk.

Regarding in vitro antifungal susceptibility, the MIC values for the *Cryptococcus* spp. environmental

strains, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) and *C. krusei* (ATCC 6528) are summarized in Table 2. The MIC ranges against *Cryptococcus* species for the tested drugs were as follows: amphotericin B, 1–0.125 $\mu\text{g/ml}$; ketoconazole, 1–0.125 $\mu\text{g/ml}$; itraconazole, 1–0.25 $\mu\text{g/ml}$; fluconazole, 8–32 $\mu\text{g/ml}$ and voriconazole, 0.5–0.125 $\mu\text{g/ml}$. All 13 *Cryptococcus* strains studied had MIC > 16 $\mu\text{g/ml}$ for caspofungin.

Among the *C. neoformans* environmental strains, antifungal resistance was detected in only one of thirteen evaluated strains, which were resistant to itraconazole (MIC = 1 $\mu\text{g/ml}$). All environmental *Cryptococcus* spp. strains were resistant to caspofungin.

Discussion

Some studies have demonstrated that just as *Cryptococcus* spp. can be found in bird droppings, and occasionally in cloacae [5, 14, 29], other yeast species can also be present [6, 20]. A study carried out by Cafarchia et al. [5], through analysis of the fungal microbiota of the cloacae of 421 migratory birds, showed that *Rhodotorula mucilaginosa* was the most commonly isolated yeast, followed by *Candida* spp. and *Trichosporon cutaneum*.

Cryptococcus neoformans has been isolated from various sources in nature. It is commonly associated with pigeon droppings and less frequently with the droppings of other birds, such as psittaciformes and passeriformes [4, 14]. The pioneering works of Emmons in the early 1950s already referred to the saprophytic relationship of *C. neoformans* with organic material rich in bird excreta [11].

Seeking to clarify the potential role of pigeons in the dissemination of pathogenic yeasts in the environment, including *C. neoformans*, in this study we performed an active search for these fungi in the cloacae and feces of pigeons as well as in trees. According to our results, 27.6% of the pigeon fecal samples contained *Cryptococcus* spp., particularly *C. neoformans* and *C. laurentii*. However, we did not manage to isolate any *Cryptococcus* species from the cloacal specimens and tree materials. Considering that we found *C. neoformans* and *C. laurentii* in pigeon feces but not in cloacae, our findings corroborate the evidence that *Cryptococcus* cannot support competition with other intestinal microbes and also

Table 1 Yeasts isolated from pigeon cloacae and droppings

Yeast species	Origin		Total of positive samples
	Cloacae <i>n</i>	Droppings <i>n</i>	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	10	10
<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	3	3
<i>Candida albicans</i>	3	9	12
<i>Candida tropicalis</i>	1	3	4
<i>Candida krusei</i>	0	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2	6	8
<i>Trichosporon</i> sp.	3	3	6
Total	9	36	45

Table 2 Minimal inhibitory concentration (MIC) of azoles, amphotericin B and caspofungin against environmental *Cryptococcus* spp. strains

Environmental strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	Amphotericin B	Ketoconazole	Itraconazole	Fluconazole	Voriconazole	Caspofungin
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>						
CEMM 3-2-074	0.25	0.25	0.5	32	0.125	> 16
CEMM 3-2-066	0.25	0.5	0.25	8	0.125	> 16
CEMM 3-2-078	0.125	0.25	0.5	8	0.125	> 16
CEMM 3-2-064	1	0.25	0.5	8	0.125	> 16
CEMM 3-2-075	1	1	0.25	8	0.125	> 16
CEMM 3-2-063	0.125	0.125	0.5	16	0.125	> 16
CEMM 3-2-080	0.125	0.5	0.5	8	0.125	> 16
CEMM 3-2-067	0.5	1	0.5	8	0.125	> 16
CEMM 3-2-076	1	1	0.5	8	0.125	> 16
CEMM 3-2-060	0.25	1	1	32	0.25	> 16
<i>Cryptococcus laurentii</i>						
CEMM 3-2-065	1	0.5	0.5	8	0.125	> 16
CEMM 3-2-079	0.25	0.5	0.25	32	0.5	> 16
CEMM 3-2-058	0.25	0.5	0.25	8	0.125	> 16
Quality controls						
<i>Candida krusei</i> ATCC 6528	1	0.25	0.5	64	0.125	0.25
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	0.125	0.5	1	0.03	0.5

cannot tolerate pigeons' high body temperature. Additionally, our data show that pigeons are not direct carriers of *Cryptococcus* spp., but could play an important role in the environmental contamination of yeasts by their feces. In fact, few researchers have reported isolating *C. neoformans* from pigeon cloaca [30], and it is well accepted that isolation of fungi from the surfaces of these animals, i.e., beaks, feathers and legs, might be related to environmental contamination [18].

Soares et al. [33] isolated *C. neoformans* var. *grubii*, *C. laurentii* and *C. albidus* in the droppings of urban pigeons and in air samples from public squares, but they did not investigate the association of *Cryptococcus* spp. with trees. Regarding *C. laurentii* isolated by us from pigeon droppings, this species has been mainly associated with the cloaca [30].

In this study, we failed to isolate *C. gattii* from 50 tree samples of seven species. These results were quite surprising, as the primary niche of *C. gattii* is decaying wood [18]. Therefore, further research should be performed for isolation of *C. gattii* from environmental samples in Northeast Brazil. With respect to human cryptococcosis, in the Southeast and

South regions of Brazil, *C. neoformans* var. *grubii* is the main agent of human cryptococcosis, occurring in patients with AIDS. On the other hand, it seems that in Northeast Brazil, meningeal cryptococcosis is caused mainly by *C. gattii* [23, 32].

Other yeasts were found in the present study. *Candida* was the genus most often isolated, followed by *Trichosporon* sp. and *R. mucilaginosa*. These findings are interesting because these fungi can be pathogenic for humans and others animals.

The *Candida* species, mainly *C. albicans*, isolated in this study are considered important pathogens for both humans and animals, especially in immunocompromised individuals [2, 8, 25]. Some species of *Trichosporon*, as well as *Rhodotorula*, are reported as causes of opportunistic mycoses in patients with cancer and AIDS [35].

Regarding the study of plant matter, despite the very low positive rate (1.4%), which did not allow any correlation with the pigeons, the isolation of *C. glabrata* should still be mentioned because this species has been isolated from immunocompromised patients [31]. Species of the *Candida* genus are often reported as being commensal microorganisms that

survive in the mucosa of humans and animals. However, there are studies that have managed to isolate *Candida* species from decomposing plant matter, soil and fermented carrot juice [19, 20, 22].

With respect to the in vitro susceptibility tests, among the environmental isolates we detected resistance in one of thirteen samples studied, which was resistant to itraconazole. Souza et al. [34] studied resistance in clinical and environmental strains of *C. neoformans* and *C. gattii* in Brazil and observed that both clinical and environmental isolates showed a similar antifungal susceptibility pattern and did not show resistance. Further investigation is necessary in order to compare the antifungal susceptibility pattern of human and environmental *Cryptococcus* spp. from Northeast Brazil.

In summary, the present study showed that urban pigeons are a potential source of *Cryptococcus* spp. and other yeast species, which have pathogenic potential to humans and animals. Additionally, antifungal resistance was observed in one environmental strain of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Northeast Brazil.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the CNPq (National Scientific and Technological Research Council—Process: 475724/2006-2).

References

- Bauwens L, Swinne D, Vroey CDE, Meurichy WDE. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the avifauna of the Antwerp Zoological Gardens. *Mykosen*. 1986;29:291–4.
- Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, Condeiro RA, Soares-Junior FA, Monteiro AJ, et al. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Milassetia pachydermatis* strains from dogs. *Vet J*. 2007;174:147–53.
- Brilhante RSN, Rocha MFG, Condeiro RA, Rabenhoist SHB, Granjeiro TB, Monteiro AJ, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Microsporum canis* strains in north-east Brazil. *J Appl Microbiol*. 2005;99:776–82.
- Calcedo LD, Alvarez MI, Delgado M, Cardenas A. *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the city zoo of Cali. *Mycopathologia*. 1999;147:121–4.
- Carfaglia C, Camada A, Romito D, Campolo M, Quaglia NC, Tullio D, et al. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia*. 2006;161:229–34.
- Carfaglia C, Romito D, Itra R, Camada A, Montagna MT, Omato D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Med Mycol*. 2006;44:485–92.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 2002. NCCLS document M27-A2.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Mata DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2816–23.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelscultures; 2000.
- Duncan C, Stephen C, Lester S, Bartler KH. Sub-clinical infection and asymptomatic carriage of *Cryptococcus gattii* in dogs and cats during an outbreak of cryptococcosis. *Med Mycol*. 2005;43:511–5.
- Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with pigeon (*Columba livia*). *Am J Trop Med Hyg*. 1955;62:227–32.
- Enache-Angoulvant A, Chandener J, Symoens F, Laoube P, Bolognini J, Douchet C, et al. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* Serotypes. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1261–5.
- Esplinel-Ingroff A. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12, 052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:121–36.
- Filipi WFO, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lázia M. Cativo de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35:591–5.
- Gründer S, Maysner P, Redmann T, Kaleta EF. Mycological examination on the fungal flora of the chicken comb. *Mykosen*. 2005;48:114–9.
- Kwon-Chung KJ, Póladcheck I, Bennett JE. 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*. 1982;15:535–7.
- Lemos LS, Santos ASD, Vieira-da-Mota O, Texeira GN, Carvalho ECQ. Pulmonary cryptococcosis in slaughtered sheep: anatomopathology and culture. *Vet Microbiol*. 2007;125:350–4.
- Lin X, Heltman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol*. 2005;60: 69–105.
- Loureiro STA, Cavalcanti MAQ, Neves RP, Passavante JZO. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco State, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2005;36:333–7.
- Mancianti F, Nardoni S, Ceccherelli R. Occurrence of yeasts in primates droppings from captive birds in Italy. *Mycopathologia*. 2004;153:121–4.
- Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Haiza LC, Melhem MSC, Mendes-Giannini MJS. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004;49:41–7.
- Mussa AY, Randhawa HS, Khan ZU. Decaying wood as a natural habitat of melanin-forming (Mel+) variant of *Cryptococcus laurentii*. *Curr Sci*. 2000;79:1471–4.

23. Nishikawa MM, Luzen MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, 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;41(1):73–7.
24. Nosanchuk JD, Shoham S, Fries BC, Shapiro DS, Levitz SM, Casadevall A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann Intern Med*. 2000;132:205–8.
25. Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58:77–82.
26. Pappalardo MMCS, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45:299–305.
27. Pfaller MA, Houston A, Coffman S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. 1996;34:58–61.
28. Randhawa HS, Mussa AY, Khan ZU. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. *Mycopathologia*. 2001;151:63–9.
29. Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pomboos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40:293–8.
30. Rosario I, Hemoso de Mendonça M, Deniz S, Soto G, Alamo I, Acosta B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses*. 2005;48:421–4.
31. Ruan SY, Lee LN, Jeng JS, Yu CJ, Hsieh PR. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:136–40.
32. Santos WR, Meyer W, Wanke B, Costa SP, Trilles L, Nascimento JL, et al. Primary endemic *Cryptococcosis gatii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:813–8.
33. Soares MCB, Paula CR, Dias ALT, Caséiro MM, Pinto da Costa SO. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *gatii* in city of Santos, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005;47:31–6.
34. Souza LKH, Fernandes OFL, Kobayashi CCHA, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia City Goiás Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005;47:253–6.
35. Thakur K, Singh G, Agarwal S, Rani S. Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an human immunodeficiency virus infected patient. *Ind J Med Microbiol*. 2007;25: 166–8.
36. Vidotto V, Aoki S, Pontón J, Quindós G, Koga-Ito CY, Ruggiese A. A new caffeic acid minimal synthetic medium for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21:87–9.

8 CAPÍTULO 3

PCR-REA como importante ferramenta para identificação das espécies *Cryptococcus*

PCR-REA as an important tool for *Cryptococcus* species identification

Periódico: *Journal of Medical Microbiology* (Submetido em novembro de 2009).

Resumo

Com o intuito de realizar estudo comparativo entre métodos manuais, semi-automatizados, automatizados e PCR-REA na identificação de cepas de *Cryptococcus* spp., um total de 30 amostras obtidas de fontes diferentes foi analisado (humana, $n=12$ amostras; animal, $n=5$; ambiental, $n=13$). As cepas de *Cryptococcus* spp., previamente caracterizadas como α -*matring-type*, foram identificadas fenotipicamente por métodos manuais (características morfológicas e perfil bioquímico), pelos sistemas semi automatizado API 20C AUX e VITEK 2, assim como por PCR-REA, utilizando como alvo de amplificação a região capsular e restrição com as enzimas *AgeI*, *BsmFI* e *HpaII*. A identificação de *Cryptococcus* spp. por métodos manuais obteve duração de cinco a sete dias, sendo as cepas identificadas como *C. neoformans* ($n=12$), *C. gattii* ($n=12$) e inconclusivo ($n=6$). Considerando-se o método manual como padrão ouro na identificação de *Cryptococcus* spp., não se observou relação significativa na associação entre o método manual com os testes API 20C Aux e VITEK 2. O PCR-REA foi o método diagnóstico mais rápido e que apresentou relação significativa com o método manual. Em suma, a maior concordância de resultados entre a técnica padrão ouro e os diferentes métodos diagnósticos testados foi com a utilização do PCR-REA. Ademais, esta técnica foi mais informativa e permitiu a identificação das variedades e sorotipos, além de rapidez e especificidade de detecção.

Palavras-chaves: *Cryptococcus*. Identificação. API 20C. VITEK. PCR-REA.

PCR-REA as an important tool for *Cryptococcus* species identification

Rossana Aguiar Cordeiro ^{a,*}, Ana Karoline Freire Costa ^b, Raimunda Sâmia Nogueira
Brilhante ^a, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco^b, André Jalles Monteiro^c, José
Júlio Costa Sidrim^a, Marcos Fábio Gadelha Rocha ^{a,b}

^aDepartment of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical
Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

^bSchool of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Science, State
University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

^cDepartment of Statistics, Federal University of Ceará, Campus do Pici, s/n, Fortaleza-CE,
Brazil

***Corresponding Author: Rossana de Aguiar Cordeiro. Rua Barão de Canindé, 210;
Montese. CEP: 60425-540, Fortaleza, CE, Brazil. Phone/fax: 55 (85) 3295-1736. E-mail:
rossanacordeiro@ufc.br**

Abstract

This paper compares the performance of manual, semi-automated, automated and PCR-REA methods for the identification of *Cryptococcus* spp. strains. A total of 30 samples from different sources (12 human, 5 animal and 13 environmental samples) were analyzed. Additionally, the mating type of these strains was determined. The *Cryptococcus* spp. strains were phenotypically identified through manual methods (morphological and biochemical characteristics) and using the API 20C AUX semi-automated system, the VITEK 2 automated system and through PCR-REA, using the capsular region as amplification target followed by restriction with the enzymes *AgeI*, *BsmFI* and *HpaII*. The mating type was determined by PCR using specific mating type primers. The strains were identified as *C. neoformans* ($n=12$) and *C. gattii* ($n=12$), while the data on six strains were inconclusive. There was no significant relation between manual methods (considered the gold standard) and either the API 20C AUX or VITEK 2 method for the identification of *Cryptococcus* spp, but PCR-REA presented results that were significantly related to the manual methods. It was also the fastest diagnosis method. Overall, the highest level of agreement between manual identification and the other diagnostic methods tested was PCR-REA. All strains analyzed were alpha mating type. Finally, PCR-REA not only provided more information, such as variety and serotype identification, but it also was quick and produced satisfactory detection specificity.

Keywords: *Cryptococcus*; Identification; API 20C; VITEK; PCR-REA.

INTRODUCTION

Cryptococcus spp. are capsulated yeasts that belong to the *Basidiomycetes* class. They are normally isolated from soils contaminated with bird excreta and decaying vegetation (Granados & Castañeda, 2005, Castellá *et al.*, 2008, Cabañes, 2008, Costa *et al.*, 2009). Even though they are saprophytes, they have an extraordinary ability to cause disease in a great variety of hosts, including mammals, birds and insects (Lin & Heitman, 2006).

Within the genus *Cryptococcus*, there are approximately 39 described species, of which *C. neoformans* and *C. gattii* are the most common etiological agents of cryptococcosis in humans and animals (Fell & Statzell-Tallman, 1998). *C. neoformans* behaves as a predominantly opportunistic pathogen, primarily affecting immunocompromised hosts. Two varieties are described of this species: *C. neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *grubii*. On the other hand, *C. gattii* has been mainly reported in immunocompetent individuals (Duncan *et al.*, 2006, Quazzafi *et al.*, 2007, Wilbur & Heyborne, 2009).

Cryptococcosis starts as a pulmonary infection and disseminates through the blood, mainly reaching the central nervous system. However, it can also cause lesions in other organs, such as the skin, kidneys and prostate, as well as the ocular and osteo-articular regions (Quazzafi *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008; Huston & Mody, 2009). Early disease diagnosis is of great importance for the patient's clinical evolution, since it can be a grave and potentially fatal disease, even under medical care (Bartlett *et al.*, 2008).

C. neoformans and *C. gattii* have a bipolar mating system, consisting of mating types α and a. Compared with strains of mating type a, strains of mating type α occur more predominantly in environmental and clinical sources and are more virulent (Ren *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2009).

The laboratory model for cryptococcosis investigation has been based on direct microscopy, culture and subsequent biochemical identification and immunodiagnosis. (Huston & Mody, 2009). However, these tests have limitations that can compromise the final

diagnosis, such as the time and labor required for identification. The results can also be variable due to subjective interpretation of phenotypic tests (Borman *et al.*, 2008). Automated and semi-automated methods can be inconclusive because they frequently depend on supplementary tests for complete microorganism identification (Gundes *et al.*, 2001, Massonet *et al.*, 2004). Immunodiagnosis can return false-positive results due to cross-reactivity with rheumatoid factor and *Trichosporon* spp., as well as contamination with gram-negative rods (Huston & Mody, 2009). Currently, molecular methods for detection of *C. neoformans* and *C. gattii* specific gene sequences from clinical specimens and cultures have been available, though they are not routinely used (Bovers *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2008).

To provide more information on the various identification techniques, we performed a comparative study of manual, semi-automated, automated and molecular (PCR-REA) methods for the identification of *Cryptococcus* strains from different sources. Additionally, we identified the mating type of these strains.

METHODS

Fungal strains

A total of 30 *Cryptococcus* spp. strains were used in this study. Twelve were from human clinical cases, five from animals and thirteen from pigeon excreta. These isolates belong to the Fungal Collection of the Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Brazil, and were stored at -20 °C, on 2% potato dextrose agar, supplemented with glycerol.

Manual, semi-automated and automated phenotypic identification

Initially the *Cryptococcus* spp. strains were phenotypically characterized through manual methods, according to their morphological characteristics and biochemical profile. The micromorphological characteristics were analyzed on cornmeal-Tween 80 agar (Difco Laboratories, Detroit, USA), after incubation for a 48 hours at 30 °C, for visualization of

blastoconidia, with no hyphae or pseudohyphae (De Hoog *et al.*, 2000). The biochemical tests applied were: 1) urease test, on Christensen's urea agar (Difco Laboratories, England); 2) phenoloxidase activity on Niger seed agar (NSA) medium (Plast Labor, Brazil); and 3) chemotyping on CGB medium (L-canavanine, glycine, bromothymol blue), through growth detection of *C. gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 1982, De Hoog *et al.*, 2000). The same strains were also identified through the API 20C AUX semi-automated system (BioMérieux, France), and VITEK 2 automated system (BioMérieux Vitek, Hazelwood, France), according to the respective manufacturer's instructions.

Genotypic analysis

DNA extraction

DNA extraction was performed according to Stirling (2003) with some modifications. First, the *Cryptococcus* spp. strains were grown on potato dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) during 48 hours at 30 °C. Then, a fungal suspension of approximately 2×10^8 cells, which was determined through spectrophotometry (Ultrospec 1100 pro, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), was prepared for each sample, in 1.0-mL microtubes containing PBS (phosphate buffered saline). The suspension was vortexed for 15 seconds and centrifuged twice at 4000 rpm. Then approximately 1 mL of 2% Triton X-100 (Sigma Aldrich, Germany) was added to the fungal suspension and it was incubated in a bath at 100 °C for 10 minutes. After this procedure, the mixture was left at 28 °C for five minutes and then centrifuged at 14000 rpm for one minute. The supernatant was collected, transferred to another microtube and frozen at -20 °C. Before performing PCR, each DNA sample was quantified through spectrophotometry (Ultrospec 1100 pro) (Ausubel *et al.*, 2002)

Amplification of CAP59 and Restriction enzyme analyses (REA)

The target region chosen for PCR-REA was *CAP59* gene, which is specific for *C. neoformans* and *C. gattii* and encodes for capsule production. The PCR-based method was carried out according to the procedure in Enanche-Angoulvant *et al.* (2007). PCR was

performed in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The estimated amplicon size was approximately 400bp. After the amplification reaction, the PCR products were submitted to enzymatic digestion with three restriction enzymes, *BsmFI*, *HpaII* and *AgeI* (New England BioLabs, USA), according to the manufacturer's instructions. The fragments were separated in 3.5% agarose gel containing ethidium bromide at 0.25 μg^{-1} and 100-bp molecular weight marker to estimate band sizes. Electrophoresis was conducted in TBE 1X (0.1 M Tris, 0.09 M boric acid, 1 mM EDTA) at 50V for three hours.

Mating type

The mating type was determined by PCR using *MAT* alpha and *MAT-a* specific primers and the amplification reactions were carried out as previously described by Trilles *et al.* (2008).

Statistical analysis

Fisher's exact test was applied to analyze the association between the manual identification method, considered the gold standard, and API 20C, VITEK 2 or PCR-REA, as well as the association between PCR-REA and API 20C or VITEK 2. When $P < 0.05$, the test was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenotypic identification

The manual phenotypic identification of *Cryptococcus* strains took from five to seven days from the recovery from the fungal collection. The strains were identified as *C. neoformans* ($n=12$) and *C. gattii* ($n=12$), and six strains were inconclusive (Table 1). Out of the six inconclusive strains, three were weakly positive for urease production and presented white and brown colonies on NSA. The other three inconclusive isolates did not produce brown pigment on NSA medium.

Diagnosis of cryptococcosis has been routinely performed through the observation of fungal structures in clinical specimens and fungal growth on a suitable culture medium,

followed by biochemical and physiological characterization of the microorganism. These manual procedures are considered the gold standard for fungal identification (Feng *et al.*, 2008). However, variations observed in these tests can influence the results' final interpretation. (Huston & Mody, 2009).

Some authors have discussed the true importance of phenotypical characteristics observed in laboratory routines for diagnosing the main pathogenic species of the *Cryptococcus* genus (Mandal *et al.*, 2005). Concerning melanin production, it has been shown that most of *C. neoformans* and *C. gattii* strains produce brown pigment when grown on culture media enriched with phenolic substrates, something not observed for other species (Cafarchia *et al.*, 2006). Some studies demonstrate the ability of this resource as a tool to differentiate *C. neoformans* from other species of the genus (Chen *et al.*, 2001; Cafarchia *et al.*, 2006), while some other studies show that *C. albidus*, *C. laurentii* and *C. uniguttulatus* can produce melanin, even though at lower levels than those of *C. neoformans* and *C. gattii* (Ikeda *et al.*, 2002, Pedroso *et al.*, 2009). In the present study, three strains did not produce brown pigment on Niger seed agar (CEMM 05-01-076, CEMM 05-01-082 and CEMM 05-01-087). Therefore, we suspect they did not belong to the *C. neoformans* complex. Three other strains presented mixed colonies on Niger seed agar (CEMM 03-02-058, CEMM 03-02-065 and CEMM 03-02-061), which could possibly represent a fungal variation with a different profile for this characteristic or the simultaneous growth of another yeast genus within the same sample, making final identification difficult. Phenotypic tests such as of melanin production can help to direct diagnosis, even though they have low specificity and take additional time for identification. Thus, it is necessary to be cautious when analyzing mixed cultures, especially through phenotypic methods that are subjectively interpreted, which can compromise final diagnosis.

Phenotypic methods are still the most frequently used for the identification of *Cryptococcus* spp., especially the use of CGB medium to differentiate *C. gattii* from *C.*

neoformans (Leal *et al.*, 2008). However, there are reports of the existence of *C. neoformans* strains able to resist high concentrations of L-canavanine (Nakamura *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2003). In this study, 12 strains were identified as *C. gattii* and six were inconclusive according to the CGB test, due to partial color shift of the medium. CGB is a culture medium that is very susceptible to pH changes and some factors, such as quality of the reagents used, inoculum size, contamination with other microorganisms and stocking conditions, can decrease the method's sensitivity. This method is not usually used to identify other species of *Cryptococcus* spp. However, studies conducted by Bauters *et al.* (2001) showed that clinical strains of *C. laurentii* were capable of growing in the presence of L-canavanine and glycine. Therefore, care must be taken when using this resource as the only method for typing *Cryptococcus* spp. strains, since it was originally developed to differentiate *C. gattii* from *C. neoformans* and it can produce false-positive results.

No significant relation was observed between the manual identification method and the API 20C AUX (P=0.2720) or VITEK 2 (P=1.0000). When using the API 20C AUX semi-automated method, identification took at most 72 hours and the isolates were identified as *C. neoformans* (n=20) and *C. laurentii* (n=10). With the VITEK 2 automated system, the time required for identification was 48 hours and the isolates were identified as *C. neoformans* (n=24), *C. albidus* (n=2), *C. laurentii* (n=1) and *Candida parapsilosis* (n=3) (Table 1).

In our study, no significant relations were observed when comparing the API 20C AUX semi-automated and VITEK 2 automated systems to the manual tests. Among commercially available semi-automated and automated tests for yeast identification, based on the microorganism's capacity to assimilate biochemical and enzymatic substrates, API 20C AUX and VITEK 2 have been used as alternatives for the identification of *Cryptococcus* spp. (Levy *et al.*, 2008). However, these techniques have limitations because they frequently depend on supplementary tests for complete identification, such as assimilation of new sugar sources (Gundes *et al.*, 2001). Besides this, for the API 20C AUX semi-automated system,

some interpretation variability can occur, even though it is an easily observed technique (Sheppard *et al.*, 1998). Another important characteristic of such tests is that they are not capable of differentiating *C. neoformans* from *C. gattii* because these tests were developed when *C. gattii* was still considered a variety of *C. neoformans*. Now the variety *gattii* has been elevated to the species level (Kwon-Chung *et al.*, 2002). This is relevant, considering the different epidemiological aspects of these two species as well as their antifungal susceptibility profiles, since it has been reported that *C. gattii* is less susceptible to antifungal drugs (Chen *et al.*, 2000; Sorrel *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2008). However, these commercial systems are still frequently used because they are stable, easily stored and used and give results within 48-72 hours (Rosario *et al.*, 2005, Carfachia *et al.*, 2006, Levy *et al.*, 2008, Lugarini *et al.*, 2008).

Genotypic identification and mating type profile

A significant relation was only observed when comparing the manual methods to PCR-REA ($P=0.0112$). PCR-REA required 35 minutes for DNA extraction, around 1.5 hours for amplification reaction and four hours for enzymatic digestion and electrophoresis, for a total of 6.05 hours. It was the fastest method. Restriction analysis revealed only two restriction patterns among the 30 tested strains, based on the band sizes obtained and the enzyme applied (Fig. 1). *BsmFI* cleaved the PCR product of 19 strains into two fragments of approximately 200 bp each, which was compatible with *C. neoformans* var. *grubii* serotype A. On the other hand, the enzyme *AgeI* cleaved the amplicon of eight strains into two fragments of approximately 300 bp and 100 bp, which corresponded to *C. gattii* serotype B. The enzyme *HpaII* cleaved the amplicon of only four strains into two fragments of approximately 200 bp and 100 bp, compatible with *C. gattii* serotype B. These strains had already been digested by *AgeI*, thus confirming the identification. Three strains were not amplified during PCR (Table 1), the same strains that did not produce brown pigment on NSA. As for the negative control, it was not amplified during the tests.

In mating assays, the 27 strains amplified by PCR-REA were mating type alpha (Figure 2). The other tree isolates did not amplified by *MAT* primers.

We observed that PCR-REA presented the highest level of agreement when compared with the gold standard. Besides this, through this technique we simultaneously obtained varieties and serotypes of *C. neoformans* and *C. gattii* strains. In Northern and Northeastern Brazil, particularly in the state of Ceará, these data and data on the mating type profile are scarce (Nishikawa *et al.*, 2003; Trilles *et al.*, 2008). This type of information is important because it helps surveillance authorities to circulate strain profiles or to discover atypical genotypes, such as Colombian isolates, which showed high incidence of mating a in clinical and environmental *C. gattii* strains (Escadón *et al.*, 2006). Therefore, this study provided important data concerning the phenotypic and genetic profiles of these strains, which had not been described before.

Among the various techniques of DNA manipulation and analysis, PCR, which was developed at the end of the 1980s, has provided the greatest advances in the diagnosis of cryptococcosis. It has sufficient sensitivity and specificity to detect minimal amounts of the fungus. Protocols with restriction enzymes are frequently employed for the identification of these species (Frasés *et al.*, 2009). According to our data, three strains were not identified by PCR-REA (CEMM 05-01-076, CEMM 05-01-082 and CEMM 05-01-087). We believe they do not belong to the species for which the primers used are indicated, such as *C. neoformans* and *C. gattii*.

Based on the data obtained during this study, PCR-REA was the method that presented the highest level of agreement with the manual tests for identification of *Cryptococcus* spp. Currently, PCR provides more comprehensive results, since it allows the simultaneous identification of varieties and serotypes. It also high specificity and is quick because it can be automated. Diagnostic methods for the identification of *Cryptococcus* species need to be accurate.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Specialized Medical Mycology Center (CEMM-Federal University of Ceará, Brazil) for providing the materials and facilities for this study and for excellent guidance given. This work was supported by the National Research Council (CNPq - Process: 473881/2008-0).

REFERENCES

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (2002). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 5th edn. New York: Wiley.
- Bartlett, K. H., Kidd, S. E. & Kronstad & J. W. (2008). The Emergence of *Cryptococcus gattii* in British Columbia and the Pacific Northwest. *Curr Infect Dis Rep* **10**, 58-65.
- Bauters, T. G. M., Swinne, D., Boekhout, T., Noens, L. & Nelis, H. J. (2001). Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. *Mycopathologia* **153**, 133-135.
- Borman, A. M., Linton, C. J., Miles, S. J. & Johnson, E. M. (2008). Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemoth* **61**, i7-i12.
- Bovers, M., Diaz, M. R., Hagen, F., Spanjaard, L., Duim, B., Visser, C. E., Oogveld, H. L., Scharringa, J., Hoepelman, I. M., Fell, J. W. & Boekhout, T. (2007). Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol* **45**, 1874-1883.
- Cabañes, F. J. (2008). Micosis y zoonosis: *Cryptococcus* spp. *Rev Iberoam Micol* **25**, S1-S3.
- Carfarchia, C., Camarda, A., Romito, D., Campolo, M., Quaglia, N.C, Tullio, D. & Otranto, D. (2006). Occurrence of yeast in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia* **161**, 229-34.
- Castellá, G., Abarca, M. L. & Cabañes, F. J. (2008). Criptococosis y animales de compañía. *Rev Iberoam Micol* **25**, S19-S24.
- Chen, M.F., Chiou, C. C., Liu, Y. C., Wang, H. Z. & Hsieh, K. S. (2001). *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J Clin Microbiol* **39**, 1608-1611.
- Chen, Y. C., Chang, S. C., Shih, C. C., Hung, C. C., Luh, K. T., Pan, Y. S. & Hsieh, W. C. (2000). Clinical features and *in vitro* susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn Micr Infec Dis* **36**, 175-183.

- Costa, A. K., Sidrim, J. J., Cordeiro, R. A., Brilhante, R. S. N., Monteiro, A. J. & Rocha, M. F. (2009).** Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*. doi 10.1007/s11046-009-9245-1.
- De Hoog G. S., Guarro, J., Gené, J. & Figueiras, M. J. (2000).** *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmiscultures/Universitat Rovira i Virgili.
- Duncan, C., Stephen, C. & Campbell, J. (2006).** Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. *Can Vet J* **47**, 993-998.
- Enanche-Angoulvant, A., Chandenier, J., Symoens, F., Lacube, P., Bolognini, J., Douchet, C., Poirot, J. L. & Hennequin, C. (2007).** Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *J Clin Microbiol* **45**, 1261-1265.
- Escandón, P., Sánchez, A., Martínez, M., Meyer, W. & Castañeda, E. (2006).** Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species 6 complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res* **6**, 625-635.
- Fell, J. W. & Statzell-Tallman, A. (1998).** *Cryptococcus* Vuillemin. In *The yeasts: a taxonomic study*, pp 742-767. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. New York: Elsevier.
- Feng, X., Yao, Z., Ren, D., Liao, W. & Wu, J. (2008).** Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. *FEMS Yeast Res* **8**, 930-938.
- Frasés, S., Ferrer, C., Sánchez, M. & Colom-Valiente, M. F. (2009).** Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. *Rev Iberoam Micol* **26**, 112-117.

- Granados, D. P. & Castañeda, E. (2005).** Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb Ecol* **49**, 282-290.
- Gundes, S. G., Gulenc, S. & Bingol, R. (2001).** Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C AUX systems in the identification of clinically significant yeasts. *J Med Microbiol* **50**, 1105-1110.
- Huston, S. M. & Mody, C. H. (2009).** Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clin Chest Med* **30**, 253-264.
- Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E. S. & Shinoda, T. (2002).** Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* **40**, 1214-1218.
- Khan, Z. U., Al-Anezi, A. A., Chandy, R. & Xu, J. (2003).** Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *J Med Microbiol* **52**, 271–275.
- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I. & Bennett, J. E. (1982).** Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J Clin Microbiol* **15**, 535-537.
- Kwon-Chung, K. J., Boekhout, T., Fell, J. W. & Diaz, M. (2002).** Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* **51**, 804-806.
- Leal, A. L., Faganello, J., Bassanesi, M. C. & Vainstein, M. H. (2008).** *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Med Mycol* **46**, 377-383.
- Levy, P. Y., Habib, G., Reynaud-Gaubert, M., Raoult, D. & Rolain JM (2008).** Pericardial effusion due to *Cryptococcus neoformans* in a patient with cystic fibrosis following lung transplantation. *Int J Infect Dis* **12**, 452.

- Lin X. & Heitman, J. (2006).** The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* **8**, 69-105.
- Lin, X., Patel, S., Litvintseva, A. P., Floyd, A., Mitchell, T. G. & Heitman, J. (2009).** Diploids in the *Cryptococcus neoformans* serotype a population homozygous for the a mating type originate via unisexual mating. *PLoS Pathog* **5**. doi:10.1371/journal.ppat.1000283.
- Lugarini, C., Goebel, C. S., Condas, L. A. Z., Muro, M. D., Farias, M. R., Ferreira, F. M. & Vainstein, M. H. (2008).** *Cryptococcus neoformans* isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* **166**, 61-69.
- Mandal, P., Banerjee, U., Casadevall, A. & Nosanchuk, J. D. (2005).** Dual infections with pigmented and albino strains of *Cryptococcus neoformans* in patients with or without human immunodeficiency virus infection in India. *J Clin Microbiol* **43**, 4766-4772.
- Massonet, C., Eldere, J. V., Vanechoutte, M., Baere, T., Verhaegen, J. & Lagrou, K. (2004).** Comparison of VITEK 2 with ITS2-Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Yeast Species. *J Clin Microbiol* **42**, 2209-2211.
- Nakamura, Y., Kano, R., Sato, H., Watanabe, S., Takahashi, H. & Hasegawa, A. (1998).** Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromthymol blue medium. *Mycoses* **41**, 35-40.
- Nishikawa, M. M., Lazéra, M. S., Barbosa, G. G., Trilles, L., Balassiano, B. R., Macedo, R. C. L., Bezerra, C. C. F., Pérez, M. A., Cardarelli, P. & Wanke, B. (2003).** Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* **41**, 73-77.
- Pedroso, R. S., Ferreira, J. C. & Candido, R. C. (2009).** The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Res* **164**, 221-227.
- Quazzafi, Z., Thiruchunapalli, D., Birkenhead, D., Bell, D. & Sandoe, J. A. T. (2007).** Invasive *Cryptococcus neoformans* infection in an asplenic patient. *J Infect* **55**, 566-568.

- Ren, P., Springer, D. J., Behr, M. J., Samsonoff, W. A., Chaturvedi, S. & Chaturvedi, V. (2006).** Transcription factor *STE12a* has distinct roles in morphogenesis, virulence, and ecological fitness of the primary pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*. *Eukaryot Cell* **5**, 1065-1080.
- Rosario, I., Hermoso de Mendonza, M., Deniz, S., Soro, G., Alamo, I. & Acosta, B. (2005).** Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses* **48**, 421-4.
- Shen, Y. Z., Wang, J. R. & Lu, H. Z. (2008).** Voriconazole in an infant with cryptococcal meningitis. *Chinese Med J Peking* **121**, 286-288.
- Sheppard, D. C., Souza, E., Hashmi, Z., Robson, H. G. & Rene, P. (1998).** Evaluation of the Auxacolor System for biochemical identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* **36**, 3726-3727.
- Soares, B. M., Santos, D. A., Kohler, L. M., César, G. C., Carvalho, I. R., Martins, M. A. & Cisalpino, P. S. (2008).** Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Rev Iberoam Micol* **25**, 242-245.
- Sorrell, T. C. (2001).** *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* **39**, 155-68.
- Stirling, D. (2003).** DNA extraction from fungi, yeast and bacteria. In *Methods in Molecular Biology: PCR Protocols*, pp. 53-54. Edited by J. M. S. Bartlett & D. Stirling. Totowa, New Jersey: © Humana Press Inc.
- Trilles, L., Lazéra, M. S., Wanke, B., Oliveira, R. V., Barbosa, G. C., Nishikawa, M. M., Morales, B. P. & Meyer, W. (2008).** Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**, 455-462.
- Wilbur, L. & Heyborne, R. (2009).** Transient loss of consciousness caused by cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient: a case report. *Cases J* **2**, 60.

Table 1. Comparison between the manual methods and the API 20C AUX semi-automated system, VITEK 2 automated system and PCR-REA for the identification of *Cryptococcus* spp. strains isolated from clinical, veterinary and environmental samples.

Register number	Origin	Manual	API 20C AUX	VITEK 2	PCR-REA	SER.
Human						
CEMM 05-01-084	CSF	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-072	CSF	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-073	CSF	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	B
CEMM 03-02-068	CSF	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-077	Sputum	<i>C. gattii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	B
CEMM 03-02-070	CSF	<i>C. gattii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	B
CEMM 03-02-062	CSF	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	B
CEMM 03-02-057	Bood	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-069	Skin	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	B
CEMM 03-02-071	CSF	<i>C. gattii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	B
CEMM 03-02-059	Skin	<i>C. gattii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 05-01-072	CSF	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
Veterinary						
CEMM 03-02-061	Snot biopsy (cat)	<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>C. neoformans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 05-01-090	Lymphonode (dog)	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 05-01-076	Crop (cockatiel)	<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>C. laurentii</i>	<i>C. albidus</i>	Unidentified	-
CEMM 05-01-082	Cloaca (cockatiel)	<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>	Unidentified	-
CEMM 05-01-087	Crop (cockatiel)	<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>C. laurentii</i>	<i>C. albidus</i>	Unidentified	-
Environmental						
CEMM 03-02-064	Pigeon feces	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-063	Pigeon feces	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-078	Pigeon feces	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-067	Pigeon feces	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-060	Pigeon feces	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-076	Pigeon feces	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-058	Pigeon feces	<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>C. laurentii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-066	Pigeon feces	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-079	Pigeon feces	<i>C. gattii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	B
CEMM 03-02-074	Pigeon feces	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	B
CEMM 03-02-065	Pigeon feces	<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>C. laurentii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-080	Pigeon feces	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A
CEMM 03-02-075	Pigeon feces	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	A

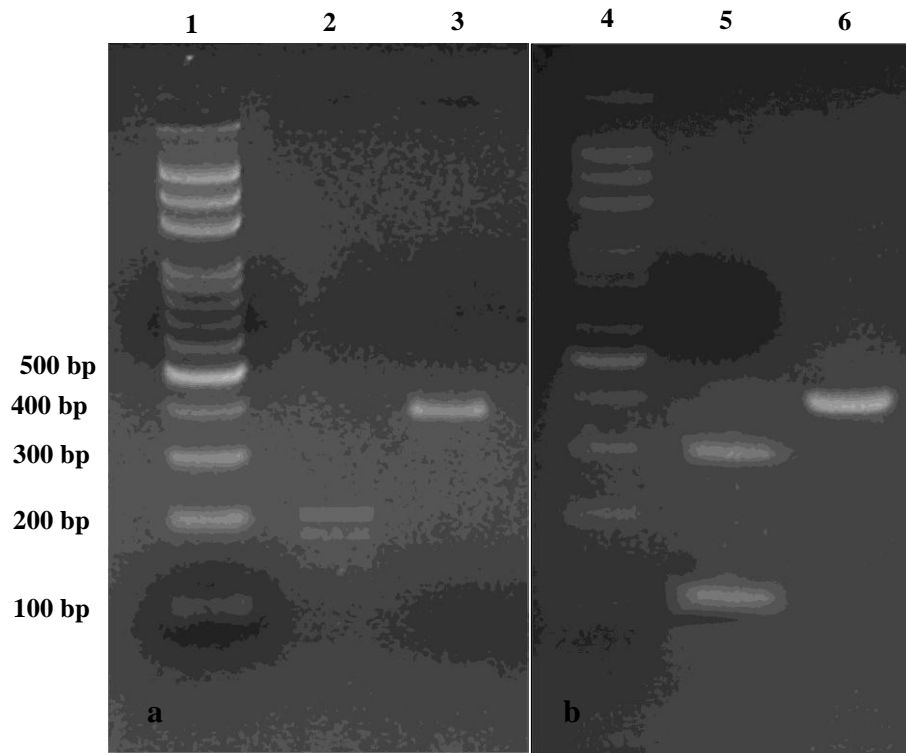


Figure 1. Agarose gel (3%) electrophoresis, showing the restriction profile obtained with the enzymes *Bsm*FI (A) and *Age*I (B). Lanes 1 and 4: 100-bp DNA ladder; lane 2: *C. neoformans* var. *grubii* ser. A (CEMM 03-02-072); lane 3 and 6: Amplicons obtained through the amplification of the gene *CAP59*; lane 5: *C. gattii* ser B (CEMM 03-02-079).

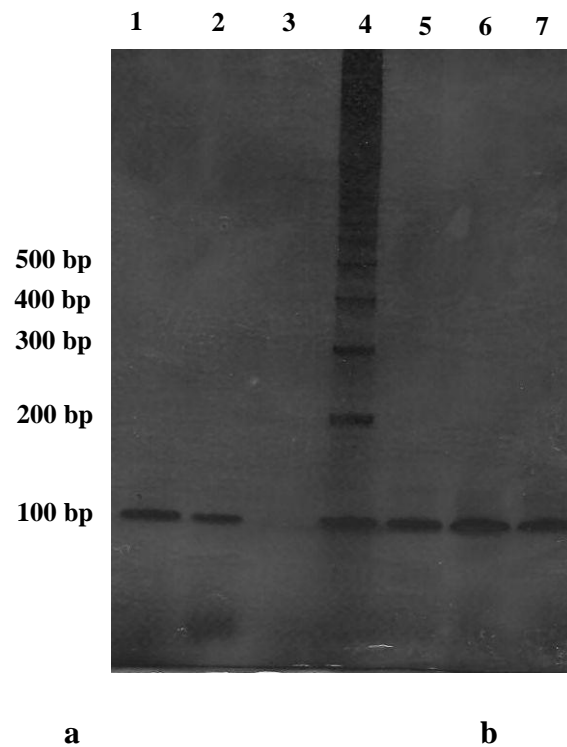


Figura 2. Polyacrylamide gel (6%) electrophoresis showing α -mating-type profile of the isolates. Lanes 1-2: *C. gattii* ser. B (CEMM 03-03-072, CEMM 03-02-079, respectively); lane 3: negative control; lane 4: 100-bp DNA ladder; lane 5-6: *C. neoformans* var. *grubii* ser. A (CEMM 03-02-080, CEMM 05-01-084, 05-01-090, respectively).

9 CONCLUSÕES

- As plantas dos gêneros *Azadirachta*, *Cassia*, *Eucalyptus*, *Mangifera*, *Psidium* e *Zizyphus* não são nichos importantes para *Cryptococcus* spp. na região metropolitana de Fortaleza, Ceará. Contudo novas buscas ativas devem ser realizadas para se determinar os nichos ecológicos deste microrganismo na região.

- Resistência antifúngica primária frente a itraconazol foi detectada em uma cepa de *C. neoformans* var. *neoformans* de origem ambiental, fazendo-se necessárias mais investigações no sentido de monitorar a resistência antifúngica desta levedura.

- Dentre os métodos disponíveis para identificação de *Cryptococcus* spp., o PCR-REA apresentou maior nível de concordância de resultados com a técnica padrão ouro; e demonstrou ser mais informativo do que os métodos manuais, pois permitiu a identificação das variedades e sorotipos de *C. neoformans* e *C. gattii*, além de rapidez e especificidade de detecção.

- *C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A e, em segundo lugar, *C. gattii* sorotipo B, caracterizaram-se como os tipos predominantes na região, tanto em isolados ambientais como em amostras clínicas.

- O perfil *mating-type* das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* analisadas caracterizou-se como tipo α .

10 PERSPECTIVAS

- Com a realização desta presente pesquisa, acredita-se ter contribuído para um melhor entendimento acerca da epidemiologia, diagnóstico micológico e perfil de sensibilidade antifúngica de *Cryptococcus* spp., impulsionando, assim, a linha de pesquisa em criptococose do Centro Especializado em Micologia Médica, da UFC, especialmente na área de Biologia Molecular deste gênero. Estudos futuros poderão ser realizados ampliando o número de amostras clínicas e ambientais com a obtenção de isolados oriundos de regiões diferentes do Estado do Ceará. As características de fenotipagem e genotipagem fornecidas agregarão importantes informações à micoteca do CEMM, conforme realizado nos centros de referência, sendo possível disponibilizar cepas devidamente caracterizadas de *C. neoformans* e *C. gattii* para estudos específicos.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, v. 161, p. 83-91, 2006.

ALMEIDA, A. M. F.; MATSUMOTO, M. T.; BAEZA, L. C.; OLIVEIRA E SILVA, R. B.; KLEINER, A. A. P.; MELHEM, M. S. C.; GIANNINI, M. J. S. M.; The Laboratory Group on Cryptococcosis. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 7, p. 152–164, 2007.

ALSPAUGH, J. A.; CAVALLO, L. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. *RAS1* regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, v. 36, p. 352-365, 2000.

ALSPAUGH, J. A.; DAVIDSON, R. C.; HEITMAN, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Contributions to Microbiology*, v. 5, p. 217-238. 2000.

AMJAD, M.; KFOURY, N.; CHA, R.; MOBARAK, R. Quantification and assessment of viability of *Cryptococcus neoformans* by LightCycler amplification of capsule gene mRNA. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, p. 1201-1206, 2004.

ANTONIEWICZ, L.; RELIJC, D.; POITSCHKEK, C.; PRESTERL, E.; GEUSAU, A. Mucosal *Candida* infection and colonisation as well as associated risk factors in solid organ transplant recipients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v. 28, p. 945–957, 2009.

AOKI, F. H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N. F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z.; BRANCHINI, M. L. M. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of Random Amplified Polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 315-20, 1999.

APPLIED BIOSYSTEMS. 2007. AFLP™ Microbial Fingerprinting Protocol.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York, 2002.

BARCHIESI, F.; COGLIATI, M.; ESPOSTO, M. C.; SPREGHINI, E.; SCHIMIZZI, A. M.; WICKES, B. L.; SCALISE, G.; VIVIANI, M. A. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. *Journal of Infection*, v. 51, n. 1, p. 10-6, Jul. 2005.

BARLUZZI, R.; BROZZETTI, A.; MARIUCCI, G.; TANTUCCI, M.; NEGLIA, R. G.; BISTONI, F.; BLASI, E. Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain. *Journal of Neuroimmunology*, v. 109, p. 75–86, 2000.

- BARÓ, T.; TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; HERMOSO DE MENDOZA, M.; NORERA, Y.; ALÍA, C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, 458-461, 1998.
- BARRETO DE OLIVEIRA, M. T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 1356-1359, 2004.
- BARTLETT, K. H.; KIDD, S. E.; KRONSTAD, J. W. The Emergence of *Cryptococcus gattii* in British Columbia and the Pacific Northwest. *Current Infectious Disease Reports*, v. 10, p.58-65, 2008.
- BAUTERS, T. G. M.; SWINNE, D.; BOEKHOUT, T.; NOENS, L.; NELIS, H. J. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. *Mycopathologia*, v. 153, p. 133-135, 2001.
- BAUWENS, L.; SWINNE, D.; VROEY, C. D. E.; MEURICHY, W. D. E. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. *Mykosen*, v. 29, p. 291-294, 1986.
- BEATTY, J. A.; BARRS, V. R; SWINNEY, G. R; MARTIN, P. A; MALIK, R. Peripheral vestibular disease associated with cryptococcosis in three cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 2, p. 29-34, 2000.
- BIALEK, R.; WEISS, M.; BEKURE-NEMARIAM, K.; NAJAVAR, L. K.; ALBERDI, M. B.; GRAYBILL, J. R.; REISCHL, U. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and Real-Time PCR assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, p. 461-469, 2002.
- BIALEK, R.; KERN, J.; HERRMANN, T.; TIJERINA, R.; CECEÑAS, L.; REISCHL, U.; GONZÁLEZ, G. M. PCR Assays for Identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/Proline-Rich antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 778-783, 2004.
- BICANIC, T.; MEINTJES, G.; WOOD, R.; HAYES, M.; REBE, K.; BEKKER, L.; HARRISON, T. Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naive or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin b or fluconazole. *Clinical Infectious Disease*, v. 2007, p. 45, 2008.
- BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W.C. J.; ABELN, E. C. A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, v. 147, p. 891-907, 2001.
- BOEKHOUT, T.; VAN BELKUM, A. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. *Current Genetics*, v. 32, p. 203-208, 1997.
- BORMAN, A. M.; LINTON, C. J.; MILES, S. J.; JOHNSON, E. M. Molecular identification of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. i7-i12, 2008.

- BOSE, I.; REESE, A. J.; ORY, J. J.; JANBON G.; DOERING, T. L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, v. 2, p. 655–663, 2003.
- BOVERS, M.; DIAZ, M. R.; HAGEN, F.; SPANJAARD, L.; DUIM, B.; VISSER, C. E.; OOGVELD, H. L.; SCHARRINGA, J.; HOEPELMAN, I. M.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 1874–1883, 2007.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 25, p. S4-S12, 2008.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 25, p. S4-S12, 2008a.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; HOOGVELD, H. L.; DROMER, F.; ST-GERMAIN, G.; BOEKHOUT, T. Aids patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* hybrid. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 1105-1108, 2008b.
- BOWLES, D. B.; FRY, D. R. Nasal cryptococcosis in two dogs in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 57, p. 53-57, 2009.
- BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A.; RABENHORST, S. H. B.; GRANJEIRO, T. B.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C. Phenotypical and molecular characterization of *Microsporium canis* strains in north-east Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, p. 776–82, 2005.
- BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SOARES-JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The Veterinary Journal*, v. 174, p. 147–53, 2007.
- BUTLER, M. L.; POULTER, R. T. M. The *PRP8* inteins in *Cryptococcus* are a source of phylogenetic and epidemiological information. *Fungal Genetics and Biology*, v. 42, p. 452–463, 2005.
- BYRNES III, E. J.; BILDFELL, R. J.; DEARING, P. L.; VALENTINE, B. A.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* with bimorphic colony types in a dog in western Oregon: additional evidence for expansion of the Vancouver Island outbreak. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 21, p. 133-136, 2009a.
- BYRNES, III, E. J.; LI, W.; LEWIT, Y.; PERFECT, J. R.; CARTER, D. A.; COX, G. M.; HEITMAN, J. First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. *Plos One*, v. 4, p. 1–12, 2009b.
- CABAÑES, F. J. Micosis y zoonosis: *Cryptococcus* spp. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 25, p. S1-S3, 2008.

- CAICEDO, L. D.; ALVAREZ, M. I.; DELGADO, M.; CARDENAS, A. *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the city zoo of Cali. *Mycopathologia*, v. 147, p. 121-124, 1999.
- CALVO, B. M.; COLOMBO, A. L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M. S.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p.2348-50, 2001.
- CAPOOR, M. R.; NAIR, D.; DEB, M.; GUPTA, B.; AGGARWAL, P. Clinical and mycological profile of cryptococcosis in a tertiary care hospital. *Indian Journal of medical Microbiology*, v. 25, p. 401-404, 2007.
- CAPOOR, M. R.; MANDAL, P.; DEB, M.; AGGARWAL, P.; BANERJEE, U. Current scenario of cryptococcosis and antifungal susceptibility pattern in India: a cause for reappraisal. *Mycoses*, v. 51, p. 258-265, 2008.
- CARFARCHIA, C.; CAMARDA, A.; ROMITO, D.; CAMPOLO, M.; QUAGLIA, N. C.; TULLIO, D.; OTRANTO, D. Occurrence of yeast in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia*, v. 161, p. 229-34, 2006a.
- CARFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, A.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Medical Mycology*, v. 44, p. 485-92, 2006b.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1998.
- CASADEVALL, A.; SPITZER, E. D. Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 1682-1683, 1995.
- CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi - The *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, p. 332-37, 2003.
- 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 Research*, v. 3, p. 405-15, 2003.
- CASTELLÁ, G.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Criptococosis y animales de compañía. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. S19-S24, 2008.
- CHABASSE, D.; GRILLOT, R. Yeast infections: from specimen collection to antifungal susceptibility testing. <http://www.biomerieux.com>. Acesso em janeiro, 2009.
- CHANDENIER, J.; ADOU-BRYN, K. D.; DOUCHET, C.; SAR, B.; KOMBILA, M.; SWINNE, D.; THÉRIZOL-FERLY, M.; BUISSON, Y.; RICHARD-LENOBLE, D. In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and

- Cambodia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v. 23, p. 506–508, 2004.
- CHANG, H. C.; LEAW, S. N.; HUANG, A. H.; WU, T. L.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 3466-3471, 2001.
- CHANG, Y. C.; CHERNIAK, R.; KOZEL, T. R.; GRANGER, D. L.; MORRIS, L. C.; WEINHOLD, L.C.; KWON-CHUNG, K. J. Structure and biological activities of acapsular *Cryptococcus neoformans* complemented with the *CAP64* gene. *Infection and Immunity*, v. 65, p. 1584-1592, 1997.
- CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, M. J.; MILLER, G. F.; PARE, D. R.; TAPEN DAM, T. D.; PAUL-SATYASEE, M.; KIM, K. S.; KYUNG, J. KWONCHUNG, K. J. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infection and Immunity*, v. 72, p. 4985-4995, 2004.
- CHANG, Y. C.; WICKES, B. L.; MILLER, G. F.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans STE12alpha* regulates virulence but is not essential for mating. *Journal of Experimental Medicine*, v. 191, p. 871-882, 2000.
- CHATURVEDI, S.; RODEGHIER, B.; FAN, J. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 2007-2009, 2000.
- CHEE, H. Y.; LEE, K. B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. *Journal of Microbiology*, v. 43, p. 469-72, 2005.
- CHEN, J.; VARMA, A.; DIAZ, M. R.; LITVINTSEVA, A. P.; WOLLENBERG, K. K.; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p.755-62, 2008.
- CHEN, S. C. A.; CURRIE, B. J.; CAMPBELL, H. M.; FISHER, D. A.; PFEIFFER, T. J.; ELLIS, D. H.; SORREL, T. C. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in Northern Australia: existence of an environmental source other than known host *Eucalypts*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, p. 547-550, 1997.
- CHEN, Y. C.; CHANG, S. C.; SHIH, C. C.; HUNG, C. C.; LUH, K. T.; PAN, Y. S.; HSIEH, W. C. Clinical features and *in vitro* susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 36, p. 175-183, 2000.
- CHENG, M. F.; CHIOU, C. C.; LIU, Y. C.; WANG, H. Z.; HSIEH, K. S. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p. 1608-1611, 2001.
- CICHON, M. Suscetibilidade a drogas antifúngicas de isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans*, procedentes da cidade de Curitiba e região metropolitana, Paraná, Brasil. Paraná, 38 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2006.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Publication of M27-A2 2002: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard, 2nd ed., Villanova, 1-30, 2002.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUER, S. A.; ARTHINGTON- SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J.; THE BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 2816-23, 2006.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. Testes de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. (Eds.), *Micologia Médica à Luz de Autores contemporâneos*, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 89-101, 2004.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. Relatório Técnico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 524-544, 2008.

CÔRREA, M. P. S. C.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R. B. S.; PARDAL, P. P. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 5, p. 505-8, 1999.

CÔRREA, M. P. S. C.; SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F. M.; IRION, K.; LONDERO, A. T. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, p. 283-287, 2002.

COSTA, A. K. F. Leveduras associadas à cloaca e a excrementos de pombos (*Columba livia*): um enfoque especial para os aspectos micológicos de *Cryptococcus* spp.. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 2007.

COSTA, A. K.; SIDRIM, J. J.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*. Accepted for publication in September 29, 2009.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; C. PINA-VA, D.; MENDONÇA, A.; GONÇALVES RODRIGUES. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *European Journal of Clin Microbiology and Infectious Disease*, v. 27, p. 365-374, 2008.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T. CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 443-448, 2000.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, v. 39, p. 166-175, 2001.

CRAMER, K. L.; GERRALD, Q. D.; NICHOLS, C. B.; PRICE, M. S.; ALSPAUGH, J. A. Transcription factor *Nrg1* mediates capsule formation, stress response, and pathogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, v. 5, p. 1147-1156, 2006.

- DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n.1, p. 21-6, 2000.
- DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelscultures, 2nd ed. Baarn, p.130-143, 156-160, 164-174, 2000.
- DELGADO, A. C. N.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M. C. B.; 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.
- DIAZ, M. R.; FELL, J. W. Use of a Suspension Array for Rapid Identification of the Varieties and Genotypes of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43 p. 3662-3672, 2005.
- D'SOUZA C. A; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. *Current Genetics*, v. 46, p. 92-102, 2004.
- DUNCAN, C.; STEPHEN, C.; LESTER, S.; BARTLETT, K. H. Sub-clinical infection and asymptomatic carriage of *Cryptococcus gattii* in dogs and cats during an outbreak of cryptococcosis. *Medical Mycology*, v. 43, p. 511-516, 2005.
- DUNCAN, C.; STEPHEN, C.; CAMPBELL, J. Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, v. 47, p. 993-998, 2006.
- EDWARDS, M. C.; GIBBS, R. A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research*, v. 3, p. S65-S75, 1994.
- EGHWRUDJAKPOR, P. O.; ALLISON, A. B. Neurocryptococcosis in a 10-year-old immunocompetent girl. *Acta Neurochirurgica*, v. 151, p. 711-712, 2009.
- ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 1642-1644, 1990.
- EMMONS, C. V. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *The Journal of Bacteriology*, v. 62, p. 685-689, 1951.
- EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with pigeon (*Columbia livia*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 62, p. 227-232, 1955.
- ENACHE-ANGOULVANT, A.; CHANDENIER, J.; SYMOENS, F.; LACUBE, P.; BOLOGNINI, J.; DOUCHET, C.; POIROT, J. L.; HENNEQUIN, C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 1261-1265, 2007.

- ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, v. 7, p. 482-486, 1999.
- ESCANDÓN, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, M.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 625-635, 2006.
- ESPINEL-INGROFF A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for fungal isolates: review of the literature. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 20, p. 121-136, 2003.
- ESPOSTO, M. C.; COGLIATI, M.; TORTORANO, A. M.; VIVIANI, M. A. Determination of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* mating type by multiplex PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, p. 1089-1104, 2004.
- ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A.; YAO, J. D. C.; WENGENACK N. L.; ROSENBLATT, J. E.; COCKERILL III, F. R.; SMITH, T. F. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, p.165-256, 2006.
- FAN, W.; KRAUS, P. R.; BOILY, M. J.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryotic Cell*, v. 4, p. 1420-1433, 2005.
- FELDMESSER, M., Y.; NOVIKOFF, K. P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 4225-4237, 2000.
- FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, v. 9, p. 273-278, 2001.
- FELL, J. W.; STATZELL-TALLMAN, A. *Cryptococcus* Vuillemin. In: Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (Eds.), *The yeasts: a taxonomic study*, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, p. 742-767, 1998.
- FENG, X.; YAO, Z.; REN, D.; LIAO, W.; WU, J. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p. 930-938, 2008.
- FERNANDES, O. F. L.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SOARES, A. J.; PEREIRA, A. J. S. C.; SILVA, M. R. R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 75-78, 2000.
- FERNANDES, O. F. L.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B., CERQUEIRA, C. H. P. V.; SILVA, M. R. R. *In vitro* susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 839-841, 2003.
- FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-Imunes*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996.

- FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZÉRA, M. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, p. 591-595, 2002.
- FORTES, S. T. *Fontes sapróbias e sexualidade de isolados clínicos e ambientais de Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans no estado de Roraima, Brasil*. Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária), Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 2001.
- FORTES, S. T.; LAZÉRA, M. S.; NISHIKAWA, M. M.; MACEDO, R. C.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses*, v.44, p. 137-40, 2001.
- FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 2243-2251, 1997.
- FRASÉS, S.; FERRER, C.; SÁNCHEZ, M.; COLOM-VALIENTE, M. F. Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 26, p. 112-117, 2009.
- FREED, E. R.; DUMA, R. J.; SHADOMY, H. J.; UTZ, J. P. Meningoencephalitis due to hyphae-forming *Cryptococcus neoformans*. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 55, p. 30-33, 1971.
- GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 3204-3209, 1999.
- GAZZONI, A. F.; SEVERO, C. B.; BARRA, M. B.; SEVERO, L. C. Atypical micromorphology and uncommon location of cryptococcosis: a histopathologic study using special histochemical techniques (one case report). *Mycopathologia*, v. 167, p. 197-202, 2008.
- 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 Research*, v. 6, p. 636-644, 2006.
- GRANADOS, D. P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microbial Ecology*, v. 49, p. 282-290, 2005.
- GRÜNDER, S.; MAYSER, P.; REDMANN, T.; KALETA, E. F. Mycological examination on the fungal flora of the chicken comb. *Mycoses*. v. 48, p.114-119, 2005.
- GUNDES, S. G.; GULENC, S.; BINGOL, R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C AUX systems in the identification of clinically significant yeasts. *Journal of Medical Microbiology*, v. 50, p. 1105-1110, 2001.
- HADRYIS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, v. 1, p. 55-63, 1992.

HAFNER, C.; LINDE, H. J.; VOGT, T.; BREINDL, G.; TINTELNOT, K.; KOELLNER, K.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Primary cutaneous cryptococcosis and secondary antigenemia in a patient with long-term corticosteroid therapy. *Infection*, v. 33, p. 86-89, 2005.

HAMILTON, J. D.; HOLDOM, M. D. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Medical Mycology*, v. 37, p. 175-89, 1999.

HAYNES, K. A.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C.; CLARKE, J. C. K.; EMILIANUS, R.; ATKINSON, C.; CANN, K. J. Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 99-102, 1995.

HEITMAN, J.; ALLEN, B.; ALSPAUGH, J. A.; KWON-CHUNG, K. J. On the origins of congenic MAT α and MAT α strains of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 28, p. 1-5, 1999.

HERSCHLEB, J.; ANANIEV, G.; SCHWARTZ, D. C. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, v. 2, p. 677-84, 2007.

HIREMATH, S. S.; CHOWDHARY, A.; KOWSHIK, T.; RANDHAWA, H. S.; SUN, S.; XU, J. Long-distance dispersal and recombination in environmental populations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from India. *Microbiology*, v. 154, p. 1513-1524, 2008.

HOANG, L. M. N.; MAGUIRE, J. A.; DOYLE, P.; FYFE, M.; ROSCOE, D. L. *Cryptococcal neoformans* infections at Vancouver hospital and health sciences center (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, p. 935-940, 2004.

HORTA, J. A.; STAATS, C. C.; CASALI, A. K.; RIBEIRO, A. M.; SCHRANK, I. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Medical Mycology*, v. 40, p. 565-571, 2002.

HSU, M. C.; CHEN, K. W.; LO, H. J.; CHEN, Y. C.; LIAO, M. H.; LIN, Y. H.; LI, S. Y. Species identification of medically important fungi by use of Real-Time LightCycler PCR. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 1071-1076, 2003.

HU, G.; LIU, I.; SHAM, A.; STAJICH, J. E.; DIETRICH, F. S.; KRONSTAD, J. W. Comparative hybridization reveals extensive genome variation in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Biology*, v. 9, p. R41, 2008.

HUFFNAGLE, G. B.; DEEPE, G. S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, p. 344-350, 2003.

HUGHES, S. S.; BUCKLEY, C. O.; NEAFSEY, D. E. Complex selection on intron size in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology and Evolution*, v. 25, p. 247-253, 2008.

HULL, C. M.; DAVIDSON, R. C.; HEITMAN, J. Cell identity and sexual development in *Cryptococcus neoformans* are controlled by the mating-type-specific homeodomain protein *Sxi1a*. *Genes and Development*, v. 16, p. 3046-3060, 2002.

- HUSTON, S. M.; MODY, C. H. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clinics in Chest Medicine*, v. 30, p. 253-264, 2009.
- IDNURM, A.; BAHN, Y. S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 753-764, 2005.
- IGREJA, R. P.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; GALHARDO, M. C. G.; KIDD, S. E.; MEYER, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Medical Mycology*, v. 42, p. 229-238, 2004.
- IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAUFMAN, L.; Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 16, p. 22-29, 1982.
- IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 1214-1218, 2002.
- ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; AOKI, S.; VIDOTTO, V. Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Mycoses*, v. 50, p. 277-281, 2007.
- JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*, v. 21, p. 2119, 2007.
- JONGWUTIWES, U.; SUNGKAHUPARPH, S.; KIERTIBURANAKUL, S. Comparison of clinical features survival between cryptococcosis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive HIV-negative patients. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 61, p. 111-115, 2008.
- JULIANO, R. S.; SOUZA, A. I.; SCHEIDE, A. I. Criptococose felina. *Revista de Patologia tropical*, v. 35, p. 65-70, 2006.
- JUNGERMAN, P. F.; SCHWARTZMAN, R. M. *Veterinary Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 200, 1972.
- KANG, Y.; TANAKA, H.; MORETTI, M. L.; MIKAMI, Y. New ITS genotype of *Cryptococcus gattii* isolated from an AIDS patient in Brazil. *Microbiology and Immunology*, v. 53, p. 112-116, 2009.
- KANO, R.; FUJINO, Y.; TAKAMOTO, N.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. PCR detection of the *Cryptococcus neoformans* CAP59 gene from a biopsy specimen from a case of feline cryptococcosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, p. 439-442, 2001.
- KANO, R.; HOSAKA, S.; HASEGAWA, A. First isolation of *Cryptococcus magnus* from a cat. *Mycopathologia*, v. 157, p. 263-264, 2004.
- KANO, R.; KITAGAWA, M.; OOTA, S.; OOSUMI, T.; MURAKAMI, O.; TOKURIKI, M.; HASEGAWA, A. First case of feline systemic *Cryptococcus albidus* infection. *Medical Mycology*, v. 46, p. 75-77, 2008.

- KATSU, M.; KIDD S.; ANDO, A.; MORETTI-BRANCHINI, M. L.; MIKAMI, Y.; NISHIMURA, K.; MEYER, W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Research*, v. 4, p. 377-388, 2004.
- KAWAKAMI, K. Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 57, p. 137-145, 2004.
- KELLER, S. M.; VIVIANI, M. A.; ESPOSTO, M. C.; COGLIATI, M.; WICKES, B. L. Molecular and genetic characterization of a serotype A MATa *Cryptococcus neoformans* isolate. *Microbiology*, v. 149, p. 131-142, 2003.
- KELLER, S.; SANDERSON, M. P.; STOECK, A.; ALTEVOGT, P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters*, v. 107, p. 102-108, 2006.
- KERL, M. E. Update on canine and feline fungal diseases. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v. 33, p. 721-47, 2003.
- KHAN, Z. U.; RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; CHOWDHARY, A.; CHANDY, R. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, p. 312–316, 2007.
- 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*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 271-275, 2003.
- KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*, v. 35, p. 51-58, 2007.
- KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P. J.; CHEN, H.; HINGSTON, A. O.; KRONSTAD, J. W.; BARTLETT, K. H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 1433-1443, 2007.
- KIDD, S. E.; GUO, H.; BARTLETT, K. H.; XU, J.; KRONSTAD, J. W. Comparative gene genealogies indicate that two clonal lineages of *Cryptococcus gattii* in British Columbia resemble strains from other geographical areas. *Eukaryotic Cell*, v. 4, p. 1629-1638, 2005.
- 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. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 17258-17263, 2004.
- KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. *Mycoses*, v. 37, p. 229-233, 1994.

- KOBAYASHI, C. C. B. A.; HASIMOTO, E.; SOUZA, L. K.; 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, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, p. 203-207, 2005.
- KOMMERS, G. D.; SOUZA, T. M.; SOUTO, M. A. M.; LA CORTE, F. D.; BARROS, C. S. L. Criptococose pulmonar granulomatosa em um equino. *Ciência Rural*, v. 35, p. 938-940, 2005.
- KRAUS, P.; BOILY, M. J.; 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. *Eukaryotic Cell*, v. 3, p. 1249-1260, 2004.
- KROCKENBERGER, M. B.; CANELD, P. J.; BARNES, J.; VOGELNEST, L.; CONNOLLY, J.; LEY, C.; MALIK, R. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): serological evidence for subclinical cryptococcosis. *Medical Mycology*, v. 40, p. 273-82, 2002.
- KURTZMAN, C. P. Formation of hyphae and chlamydospores by *Cryptococcus laurentii*. *Mycologia*, v. 65, p. 388-395, 1973.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Eds.), The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Scientific BV, 1005p, 1998.
- KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, 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). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 15, p. 535-537, 1982.
- KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, v. 67, p. 1197-1200, 1975.
- KWON-CHUNG, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, v. 68, p. 943-946, 1976a.
- KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, v. 68, p. 942-946, 1976b.
- KWON-CHUNG, K. J. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, p. 381-389, 1998.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. In: KWON-CHUNG, K. J. BENNETT, J. E., eds. *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea; Febiger, p. 397-445, 1992.
- KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v. 60, p. 602-605, 1992.
- KWON-CHUNG, K. J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*, v. 51, p. 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K. J.; HILL, W. B.; BENNETT, J. E. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 13, p. 383-387, 1981.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 15, p. 535-537, 1982.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica*, São Paulo: Editora Sarvier, 9ª ed., p. 1120, 2002.

LACAZ, C. S.; RODRIGUES, M. C. Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 40, p. 297-300, 1983.

LAGROU, K.; VAN ELDERE, J.; KEULEERS, S.; HAGEN, F.; MERCKX, R.; VERHAEGEN, J.; PEETERMANS, W. E.; BOEKHOUT, T. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. *Journal of Internal Medicine*, v. 257, p. 385-8, 2005.

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. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 2080-2086, 2003.

LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTI, M. A. S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Medical Mycology*, v. 36, p. 119-122, 1998.

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA M. F. G. *Micologia Médica: À luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 89-101, 2004.

LAZÉRA, M. S.; SALMITO CAVALCANTI, M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, v. 38, p. 379-83, 2000.

LEAL, A. L.; FAGANELLO, J.; BASSANESI, M. C.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Medical Mycology*, v. 46, p. 377-383, 2008.

LEAW, S. N.; CHANG, H. C.; SUN, H. F.; BARTON, R.; BOUCHARA, J.; CHANG, T. C. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 693-699, 2006.

LEE, H.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. *TUP1* disruption reveals biological differences between *MAT α* and *MAT α* strains of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, v. 55, p. 1222-1232, 2005.

LEIMANN, B. C. Q.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. *Cadernos da Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2582-2592, 2008.

LEMOS, L. S.; SANTOS, A. S. O.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; TEXEIRA, G. N.; CARVALHO, E. C. Q. Pulmonary cryptococcosis in slaughtered sheep: anatomopathology and culture. *Veterinary Microbiology*, v. 125, p. 350–354, 2007.

LENGELER, K. B.; FOX, D. S.; FRASER, J. A.; ALLEN, A.; FORRESTER, K.; DIETRICH, F. S.; HEITMAN, J. Mating-type *locus* of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryotic Cell*, v. 1, p. 704–718, 2002.

LENGELER, K. B.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type *locus*. *Infection and Immunity*, v. 69, p. 115–122, 2001.

LENGELER, K. B.; WANG, P.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Identification of the MAT α mating-type locus of reveals a serotype A MAT α strain thought to have been extinct. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, p. 14455–14460, 2000.

LEVY, P. Y.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M.; REYNAUD-GAUBERT, G. M.; HABIB, G. Pericardial effusion due to *Cryptococcus neoformans* in a patient with cystic fibrosis following lung transplantation. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 12, p. 452, 2008.

LIFSON, A. R.; RHAME, F. S.; BELLOSO, W. H.; DRAGSTED, U. B.; EL-SADR, W. M.; GATELL, J. M. Reporting and evaluation of HIV-related clinical endpoints in two multicenter international clinical trials. *HIV. Clinical Trials*, v. 7, p. 125–141, 2006.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 401–416, 2009

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, v. 8, p. 69–105, 2006.

LITVINTSEVA, A. P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 556–564, 2005.

LITVINTSEVA, A. P.; THAKUR R.; VILGALYS R.; MITCHELL T. G. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*, v. 172, p. 2223–2238, 2006.

LOFTUS, B. J.; FUNG, E.; RONCAGLIA, P.; ROWLEY, D.; AMEDEO, P.; BRUNO, D. V. 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.; 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.; RONSTAD, 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. 25, v. 5713, p.1321–1324, 2005.

LOPES, J. O.; COSTA, J. M.; STREHER, L. A.; CLOCK, C.; PINTO, M. S.; ALVES, S. H. Criptococose não associada à AIDS no Rio Grande do Sul: relato de oito casos e revisão da

- literatura sul-riograndense. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, p. 369-72, 1997.
- LOUREIRO, S. T.A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; NEVES, R. P.; PASSAVANTE, J. Z. O. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 333-337, 2005.
- LUGARINI, C. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de passeriformes e psittaciformes no estado do Paraná. 2007. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2007.
- LUGARINI, C.; GOEBEL, C. S.; CONDAS, L. A. Z.; MURO, M. D.; FARIAS, M. R.; FERREIRA, F. M.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, v. 166, p. 61-69, 2008.
- LUI, G.; LEE, N.; IP, M.; CHOI, K. W.; TSO, K.; LAM, E.; CHAU, S.; LAI, R.; COCKRAM, C. S. Isolates of *Cryptococcus neoformans* from infected animals reveal genetic exchange in unisexual, {alpha} mating type populations. *Eukaryot Cell*, v. 7, p. 1771-1780, 2008.
- LUO, G.; MITCHELL T. G. Rapid Identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 2860-2865, 2002.
- LURIE, H. I.; SHADOMY, H. J.; STILL, W. J. An electron microscopic study of *Cryptococcus neoformans* (Coward strain). *Sabouraudia*, v. 9, p. 15-16, 1971.
- MACDOUGALL, L.; KIDD S. E.; GALANIS E.; MAK S.; LESLIE M. J.; CIESLAK P. R.; KRONSTAD J. W.; MORSHED M. G.; BARTLETT K. H. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, p. 42-50, 2007.
- MAGEE, P. T.; GALE, C.; BERMAN, J.; DAVIS, D. Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infection and Immunity*, v. 71, p. 2299-2309, 2003.
- MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEATHERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 3140-3145. 1998.
- MALIK, R.; KROCKENBERGER, M. B.; CROSS, G.; DONELEY, R.; MADILL, D.N.; BLACK, D.; MCWHIRTER, P.; ROZENWAX, A.; ROSE, K.; ALLEY, M.; FORSHAW, D.; RUSSEL-BROWN, I.; JOHNSTONE, A. C.; MARTIN, P.; O'BRIEN, C. R.; LOVE, D. N. Avian cryptococcosis. *Medical Mycology*, v. 41, p. 115-24, 2003.
- MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHERELLI, R. Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. *Mycopathologia*, v. 153, p. 121-124. 2004.
- MANDAL, P.; BANERJEE, U.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Dual infections with pigmented and albino strains of *Cryptococcus neoformans* in patients with or without

- human immunodeficiency virus infection in India. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 4766-4772, 2005.
- MANFREDI, R.; FULGARO, C.; SABBATANI, S.; LEGNANI, G.; FASULO, G. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. *AIDS Patient Care STDS*, v. 20, p. 227-232, 2006.
- MANOSUTHI, W.; CHOTTANAPUND, S.; SUNGKANUPARPH, S. Mortality rate of early versus deferred initiation of antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients with cryptococcal meningitis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, v. 48, p. 508-509, 2008.
- MARRA, R. E.; HUANG, J. C.; FUNG, E.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). *Genetics*, v. 167, p. 619-31, 2004.
- MASSONET, C.; ELDERE, J.V.; VANEECHOUTTE, M.; BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-Fragment Length Polymorphism Analysis for identification of yeast species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 2209-2211, 2004.
- MATSUMOTO, M. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; BAEZA, L. C.; MELHEM, M. S. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 49, p. 41-47, 2004.
- MCCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Uniqueness of the mating system in *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, v. 12, p. 208-212, 2004.
- MCFADDEN, D. C.; DE JESUS, M.; CASADEVALL, A. The Physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 1868-1875, 2006.
- MENDONZA, H. M.; GARCIA, A. M.; VIZACAINO, L. L.; REMUJO, J. A. P.; GUZMÁN, J. C.; ORTIZ, A. G.; DEL PINO, J. Criptococcosis espontânea em palomo. *Archivos de Zootecnia*, v. 33, p. 125-127, 1984.
- MENEZES, E. A.; MONTEIRO, M. N. R.; ANGELO, M. R. F.; SANTOS, C. D.; CUNHA, F. A. *Cryptococcus neoformans* causing meningitis in Aids patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 35, p. 537-539, 2002.
- MENTZ, J. P.; RODRIGUEZ, R.; CABRERA, G.; MENTZ, L. M.; MENTZ, M.; GRAZZIOTIN, R. Z. Criptococose cutânea primária mimetizando carcinoma Basocelular - relato de caso. 2001. Disponível em <http://www.medstudents.com.br/original/relato/criptoco/criptoco.htm>>. Acesso em: set de 2004.
- MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Disease*, v. 9, p. 189-195, 2003.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R. P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M. A.; CHINDAMPORN, A.; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M. A.; ELLIS, D. H.; SORRELL, 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.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 2274-2280, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS. Brasília, 2002. Disponível em: www.aids.gov.br> Acesso em: 20 set. 2009.

MITCHEL, T. G; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, p. 515- 548, 1995.

MONGA, D. P.; MOHAPATRA, L. N.; KALRA, D. S. Bovine mastitis caused by *Cryptococcus neoformans*. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 58, p. 1203-1205,1970.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Medical Mycology*, v. 38, p. 385-90, 2000.

MOORE, T. D.; EDMAN, J. C. The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Molecular Cell Biology*, v. 13, p. 1962–1970, 1993.

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p. 255-258, 2006.

MOYRAND, F.; KLAPROTH, B.; HIMMELREICH, U.; DROMER, F.; JANBON, G. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, v. 45, p. 837-849, 2002.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 14, p. 389-394, 1999.

MULLIS, K. B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R. A. PCR - The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics*, v. 11, p. 249, 1995.

MUSSA, A. Y.; RANDHAWA, H. S.; KHAN, Z. U. Decaying wood as a natural habitat of melanin-forming (Mel) variant of *Cryptococcus laurentii*. *Current Science*, v. 79:1471-1474, 2000.

NAKAMURA, Y.; KANO, R.; SATO, H; WATANABE; S; TAKAHASHI; H.; HASEGAWA, A. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromthymol blue medium. *Mycoses*, v. 41, p. 35-40, 1998.

NARAYAN, S.; BATTÀ, K.; COLLOBY, P.; TAN, C.Y. *Cryptococcus* infection due *C. albidus* associate with Sezary Syndrome. *Brazilian Journal of Dermatology*, v. 143, p. 632-634, 2000.

NARDELLI, V.; CELINA, P.; MATA-ESSAYAG, S.; COLELLA, M.T.; ROSELLÓ, A.; HARTUNG DE CAPRILES, C.; LANDAETA, M. E.; OLAIZOLA, C. M. S. Identification of *Cryptococcus neoformans* isolates using Staib agar without creatinine. *Kasmera*, v. 33, p. 102-108, 2005.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; GILGADO, F.; FAGANELLO, J.; LITVINTSEVA, A. P.; LEAL Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* Deserves to Have Varieties. *PLoS ONE*, v. 4, p. e5862, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0005862.

NGAMWONGSATIT, P.; SUKROONGREUNG, S.; NILAKUL, C.; PRACHAYASITTIKUL, V.; TANTIMAVANICH, S. Electrophoretic karyotypes of *Cryptococcus neoformans* serotype A recovered from Thai patients with AIDS. *Mycopathologia*, v. 159, p. 189-197, 2005.

NICHOLS, C. B.; PERFEC, Z. H.; ALSPAUGH, J. A. A *Ras1*-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, v. 63, p. 1118-1130, 2007.

NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. L.; BEZERRA, C. C. F.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 73-77, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; SHOHAM, S.; FRIES, B. C.; SHAPIRO, D. S.; LEVITZ, S. M.; CASADEVALL A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Annals of Internal Medicine*, v. 132, p. 205-208, 2000.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 58, p. 77-82, 2007.

OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K.; KISHIDA, E.; OHKUBO, M.; AOKI, S.; NAKAMURA, K.; FUJII, T.; SIQUEIRA, I.C.; MACIEL, E. A. P.; SAKABE, S.; ALMEIDA, G. M. D.; HEINS-VACCARI, E. M.; LACAZ, C. S. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, p. 299-302, 2002.

OKABAYASHI, K.; HASEGAWA, A.; WATANABE, T. Microreview: Capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, v. 163, p. 1-8, 2007.

OKABAYASHI, K.; KANO, R.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Expression of capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, v. 160, p. 1-7, 2005.

OLIVEIRA, M. T. B.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F. A.; LAZÉRA, M. S.; LENGELER, K. B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I. N. G.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p. 1356-1359, 2004.

OLIVEIRA, M. T. B.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F. A.; LAZÉRA, M. S.; LENGELER, K. B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I. N. G.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 1356-1359, 2004.

OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G. H.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *American Journal of Pathology*, v. 164, p. 1661-1771, 2004.

OSUNA, P.; CARRAGOSO, A.; LEMOS, A.; MOCHO, M. L.; GASPAR, O. Criptococose, *Acta Medica Portuguesa*, v. 21, p. 307-313, 2008.

PAL, M.; RANDHAWA, H. S. Caprine mastitis due to *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, v. 14, p. 261-263, 1976.

PANNEERCHELVAM, S.; NORAZMI, M. N. Forensic DNA profiling and database. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, v. 10, p. 20-26, 2003.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, p. 299-305, 2003.

PASCHOAL, R. C., HIRATA, M. H.; HIRATA, R. C.; MELHEM, M. S. C.; DIAS, A. L. T.; PAULA, C. R. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46 p. 203-207, 2004.

PAVLOVA, K.; GROGORAVA, D.; HRISTOZOVA, T.; ANGELOV A. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiologica*, v. 46, p. 397-401, 2001.

PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C. Diagnóstico laboratorial da criptococose. *NewsLab* - edição 77, p. 94-102, 2006.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Reserch*, v. 164, p. 221-227, 2009.

PEDROSO, R. S.; COSTA; K. R. C.; FERREIRA; J. C.; CANDIDO, R. C. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 566-568, 2007.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 239-243, 2006.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiological Research*, v. 164, p. 221-227, 2009.

PEREIRA, A. P. C.; COUTINHO, S. D. Criptococose em cães e gatos-revisão. *Revista Clínica Veterinária*, v. 45, p. 24-32, 2003.

PERFECT, J. R., *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 463-468, 2006.

PERFECT, J. R.; MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. *Infection and Immunity*, v. 57, p. 2624-262, 1989.

PFALLER, M. A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p. 58-61, 1996.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 3807-3810, 2005.

PINTO JUNIOR, V.L.; GALHARDO, M.C.G.; LAZÉRA, M.; WANKE, B.; REIS, R. S.; PEREZ, M. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p. 230-232, 2006.

PLAYFORD, E. G.; KONG, F.; SUN, Y.; WANG, H.; HALLIDAY, C.; SORRELL, T. C. Simultaneous Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Cryptococcus* Species by Reverse Line Blot Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 876-880, 2006.

POLACHECK, I.; LEBENS, L. G.; HICKS, J. B. Development of DNA probes for early diagnosis and epidemiological study of cryptococcosis in aids patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 925-930, 1992.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 513-521, 2009.

PRYCE, T. M.; PALLADINO, S.; PRICE, D. M.; GARDAM, D. J.; CAMPBELL, P. B.; CHRISTIANSEN, K. J.; MURRAY, R. J. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/ALERT, BACTEC, and BBL MGIT media using polymerase chain reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 54, p. 289-297, 2006.

QIAGEN® Multiplex PCR Handbook. For fast and efficient multiplex PCR without optimization. www.qiagen.com. 2008.

QUAZZAFI, Z.; THIRUCHUNAPALLI, D.; BIRKENHEAD, D.; BELL, D.; SANDOE, J. A. T. Invasive *Cryptococcus neoformans* infection in an asplenic patient. *Journal of Infection*, v. 55, p. 566-568, 2007.

QUINTERO, E.; CASTAÑEDA, E.; RUIZ, A. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca – Colômbia. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 22, p.93-98, 2005.

RACHID, M; SCHECHTER, M. Manual de HIV/AIDS. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 9 ed. 240p., 2008;

RAIDAL, S. R.; BUTLER, R. Chronic rhinosinusitis and rhamphothecal destruction in a Major Mitchell's cockatoo (*Cacatua leadbeateri*) due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 15, p. 121-125, 2001.

RAMOS, J. R.; TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; SOARES, T. N.; MELO, D. B.; OLIVEIRA, G. Optimizing reproducibility evaluation for random amplified polymorphic DNA markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, p. 1384-1391, 2008.

RANDHAWA, H. S.; MUSSA, A. Y.; KHAN, Z. U. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. *Mycopathologia*, v. 151, p. 63-69, 2001.

RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; KHAN, Z. U. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, v. 41, p. 189-197, 2003.

RAPPELLI, P.; ARE, R.; CASU, G.; FIORI, P. L.; CAPPUCINELLI, P.; ACETI, A. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 3438-3440, 1998.

RASO, T. F.; WERTHER, K.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Medical Mycology*, v. 42, p. 355-62, 2004.

REIMÃO, J. Q.; DRUMMOND, E. D.; TERCETI, M. S.; LYON, J. P.; FRANCO, M. C.; SIQUEIRA, A. M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. *Mycoses*, v. 50, p. 261-264, 2007.

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, p. 293-298, 2004.

ROSA E SILVA, L. K.; STAATS, C. C.; GOULART, L. S.; MORELLO, L. G.; FUNGARO, M. H. P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. *Reserch Microbiology*, v. 159, p. 221-229, 2008.

ROSARIO, I.; HERMOSO DE MENDONZA, M.; DÉNIZ, S.; SORO, G.; ÁLAMO, I.; ACOSTA, B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses*, v. 48, p. 421-424, 2005.

- ROSARIO I.; ACOSTA, B.; COLOM, F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp: pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. S13-S18, 2008.
- ROSENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R. Clinical epidemiological study of 171 cases cryptococcosis. *Clinical Infectious Disease*, v. 18, p. 369-380, 1994.
- ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R.; WANKE, B.; CAIUBY, M. J.; CLEMENTE, H.; LAZÉRA, M. S.; MONTEIRO, P. C. F.; LONDERO, A. T. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathologia*, v. 119, p. 133-136, 1992.
- RUAN, S. Y.; LEE, L. N.; JERNG, J. S.; YU, C. J.; HSUEH, P. R. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v. 14, p. 136-140, 2008.
- SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L.; Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 813-818. 2008.
- RUMA, P.; CHEN, S. C. A.; SORREL, T. C.; BROWNLEE, A. G. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. *Letters in Applied Microbiology*, 23:312-316, 1996.
- SAAG, M. S.; GRAYBILL, R. J.; LARSEN, R. A.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; POWDERLY, W. G. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Disease*, v. 30, p. 710-718, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. In J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis (ed), Working with synthetic nucleotides probes Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- SANSINFORIANO, M. E.; RABASCO, A.; MARTÍNEZ-TRANCÓN, M.; PAREJO J. C.; HERMOSO DE MENDOZA, M.; PADILLA, J. A. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 18, p. 65-69, 2001.
- SAR, B.; MONCHY, D.; VANN, M.; KEO, C.; SARTHOU, J. L.; BUISSON, Y. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 563-565. 2004.
- SCHEIN, J. E.; TANGEN, K. L.; CHIU, R.; SHIN, H.; LENGELER, K. B.; MACDONALD, W. K.; BOSDET, I.; HEITMAN, J.; JONES, S. J. M.; MARRA, M. Physical maps for genome analysis of serotype A and D strains of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Reserch*, v. 12, p. 1445-1453, 2002.
- SCHUTZBACH, J.; ANKEL, H.; BROCKHAUSEN, I. Synthesis of cell envelope glycoproteins of *Cryptococcus laurentii*. *Carbohydrate Research*, v. 342, p. 881-893, 2007.
- SCORZETTI G.; FELL, J. W.; FONSECA, A.; TALLMAN, A. S. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, v. 24, p. 495-517, 2002.

- SHADOMY, H. J.; UTZ, J. 1966. Preliminary studies on a hyphal-forming mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, v. 53, p. 383-390.
- SHIRLEY, R. M.; BADDLEY, J. W. Cryptococcal lung disease. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 15, p. 254-260, 2009.
- SHEPPARD, D. C.; SOUZA, E.; HASHMI, Z.; ROBSON, H. G.; RENE, P. Evaluation of the Auxacolor System for biochemical identification of medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 3726-3727, 1998.
- SHRESTHA, R. K.; STOLLER, J. K.; HONARI, G.; PROCOPI, G. W.; GORDON, S.M. Pneumonia due to *Cryptococcus neoformans* in a patient receiving infliximab: possible zoonotic transmission from a pet cockatiel. *Respiratory Care*, v. 49, p. 606-609, 2004.
- SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.; KOHLER, L. M.; CÉSAR, G. C.; CARVALHO, I. R.; MARTINS, M. A.; CISALPINO, P. S. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 25, p. 242-245, 2008.
- SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; PINTO DA COSTA, S. O. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in city of Santos, SP, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, p. 31-36. 2005.
- SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, p. 31-36, 2005.
- SOMMER, U.; LIU, H.; DOERING, T. L. An alpha-1,3-mannosyltransferase of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 47724-47730, 2003.
- SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology*, v. 39, p. 155-168, 2001.
- SORRELL, T. C.; CHEN, S. C.; 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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p. 1253-1260, 1996.
- SORRELL, T.C.; ELLIS, D.H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 14, p. 42-43, 1997.
- SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; KOBAYASHI, C. C. B. A.; PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; LEMOS, J. A. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia City Goiás Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, p. 253-256, 2005.
- SPITZER, E. D.; SPITZER, S. G. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 1094-1097, 1992.

STAIB, F.; GROSSE, G.; SCHOON, A.; BERGER, R.; ABEL, T. H. Cryptococcosis: accidental post-mortem diagnosis. New aspects of pathogenesis. *Mykosen*, v. 20, p. 319-325. 1977.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 667-675, 2003.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, v. 98, p. 15245-15250, 2001.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NAKASE, T.; SHINODA, T. Intraspecific diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *C. laurentii* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 1468-1471, 2000.

SULLIVAN, C. B.; JEFFERIES, J. M. C.; DIGGLE, M. A.; CLARKE, S. C. Automation of MLST using third-generation liquid-handling technology. *Molecular Biotechnology*, v. 32, p. 219-225, 2006.

SUN, S.; XU, J. Genetic analyses of a hybrid cross between serotypes A and D strains of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*, v. 177, p. 1475-1486, 2007.

TAKASHIMA, M.; SUGITA, T.; SHINODA, T.; NAKASE, T. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1187-1194, 2003.

TAKEO, K.; TANAKA, R.; TANIGUCHI, H.; NISHIMURA, K. Analysis of ploidy and sexual characteristics of natural isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 958-963, 1993.

TAY, S. T.; HARYANTY, T. T.; NG, K. P.; ROHANI, M. Y.; HAMIMAH, H. *In vitro* susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. *Mycoses*, v.49, p.324-330, 2006.

THAKUR K, SINGH G, AGARWAL S, RANI S. Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an human immunodeficiency virus infected patient. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 25, p. 166-168, 2007.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M.; WANKE, B.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Medical Mycology*, v. 41, p. 383-90, 2003.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. C.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 455-462, 2008.

- TUCKER, S. C.; CASADEVALL, A. R. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, v. 99, p. 3165-3160, 2002.
- UPTON, A.; FRASER, J. A.; KIDD, S. E.; BRETZ, C.; BARTLETT, K. H.; HEITMAN, J.; MARR, K. A. First contemporary case of human infection with *Cryptococcus gattii* in Puget Sound: evidence for spread of the Vancouver Island outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 3086-3088, 2007.
- VANCANNEYT, M.; COOPMAN, R.; TYTGAT, R.; HENNEBERT, G. L.; KERSTERS, K. Whole-cell protein patterns, DNA base compositions and coenzyme Q types in the yeast genus *Cryptococcus* Kützing and related taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 17, p. 65-75, 1994.
- VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. DNA probe for strain typing of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 2960-2967, 1992.
- VECCHIARELLI, A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, v. 38, p. 407-417, 2000.
- VIDOTTO, V.; AOKI, S.; PONTO, N. J.; QUINDÓS, G.; KOGA-ITO, C. Y.; PUGLIESE, A. A new caffeic acid minimal synthetic médium for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 21, p. 87-89, 2004.
- VOLLMER, T.; STÖRMER, M.; KLEESIEK, K.; DREIER, J. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, p. 1919-1926, 2008.
- WATERS, S. *Cryptococcus gattii* Surveillance Summary, British Columbia 1999-2006. BC Centre for Disease Control. Disponível em: <http://www.bccdc.org/topic.php?item=109>. Acesso em setembro 2009.
- WENGENACK, N. L.; BINNICKER, M. J. Fungal molecular diagnostics. *Clinics in Chest Medicine*, v. 30, p. 391-408, 2009.
- WILBUR, L.; HEYBORNE, R. Transient loss of consciousness caused by cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient: a case report. *Cases Journal*, v. 2, p. 60, 2009.
- WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of Bacteriology*, v. 176, p. 656-664, 1994.
- WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Bioscience*, v. 2, p. 99-107, 1997.
- WINN, W. C.; KONEMAN, E. W. Koneman: Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1535, 30 p.
- WOZNIAK, K. L.; VYAS, J. M.; LEVITZ, S. M. *In vivo* role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis. *Infection and Immunity*, v. 74, p. 3817-3824, 2006.

XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Ecology*, v. 9, p. 1471-1481, 2000.

XUE, C.; TADA, Y.; DONG, X.; HEITMAN J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe*, v. 1, p. 263-262, 2007.

ZOU, C. C.; YU, Z. S.; TANG, L. F.; LIANG, L.; ZHAO, Z. Y. Primary abdominal lymphonodular cryptococcosis in children: 2 case reports and a literature review. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 41, p. E11-E15, 2006.

APÊNDICE A

CORANTES

LACTOFENOL AZUL-ALGODÃO

Objetivo:

Fluido de montagem entre lâmina – lamínula para examinar a micromorfologia das colônias fúngicas.

Composição:

Ácido láctico 20 g

Fenol 20 g

Glicerina 20 g

Azul-algodão 0,05 g

Água destilada 20 ml

Preparo:

Fundir os cristais de fenol e juntar com as demais substâncias. Esperar 24 horas e filtrar com papel filtro. Acondicionar em um frasco conta-gotas de cor âmbar. Esse corante pode ser adquirido já preparado sob as denominações *Lactophenol cotton blue* (BBL) e corante azul-algodão (Newprov). Obs. O azul-algodão pode ser substituído por qualquer azul de metileno.

Técnica:

Colocam-se duas gotas do lactofenol sobre uma lâmina de microscopia limpa. Retira-se um pequeno fragmento da colônia fúngica a ser estudada, imergindo-o no líquido. Cobrir com uma lamínula e observar ao microscópio óptico na objetiva de 40X.

NIGROSINA (TINTA DA CHINA)

Objetivo:

É um contracorante usado para visualização microscópica (direto do material clínico ou de culturas) das cápsulas de *Cryptococcus neoformans*.

Composição:

Nigrosina 10 g

Solução de formaldeído 10% 100 ml

Dissolver a nigrosina na formalina em banho-maria, aquecendo por 30 minutos. Restituir o volume evaporado. Filtrar 2 vezes em papel de filtro e acondicionar num frasco de cor âmbar.

Técnica:

Colocar sobre uma lâmina de microscopia estéril 2 gotas de nigrosina e , sobre estas, 1-0,2 ml do material clínico (líquor centrifugado, escarro, dentre outros). Homogeneizar e colocar uma lamínula. Observar ao microscópio óptico

SOLUÇÕES

TAMPÃO FOSFATO SALINA (PBS)

Objetivo:

Esse tampão possui diversos usos por ser isotônico e não tóxico para as células, mantendo o pH. É bastante utilizado para diluir substâncias ou como solução de limpeza celular.

Composição:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,39g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,67g

NaCl 8,5g

Preparo:

Dissolver os reagentes em aproximadamente 800mL de água deionizada, agitando manualmente até completa dissolução. Ajustar o pH final a 8,0 com solução de HCl 1M, transferir a solução para uma proveta e completar o volume para 1000mL. Autoclavar a 121°C por 15 minutos, deixar esfriar e estocar a 4°C.

TAMPÃO TRIS-BORATO-EDTA 5X PARA ELETROFORESE

Objetivo:

Frequentemente usado em procedimentos envolvendo ácidos nucleicos. Em corridas eletroforéticas evita que o pH não se altere e garante a formação de um campo elétrico.

Composição:

Tris base 60,5g

Ácido bórico 30,915g

EDTA 9,306g

Preparo:

Dissolver os reagentes em aproximadamente 800mL de água deionizada, agitando manualmente até completa dissolução. Ajustar o pH final a 8,0 com solução de HCl 1M, transferir a solução para uma proveta e completar o volume para 1000mL. Autoclavar a 121°C por 15 minutos, deixar esfriar e estocar a 4°C. Obs. No momento do uso, diluir o tampão para 1X ou até 0,5X.

TAMPÃO TRIS-EDTA

Objetivo:

Frequentemente usado em procedimentos envolvendo ácidos nucleicos. Exs: diluição de DNA e componente de tampões de extração de ácidos nucleicos.

Composição:

Tris base 1,12g

EDTA 1,861g

Preparo:

Dissolver os reagentes em aproximadamente 800mL de água deionizada, agitando manualmente até completa dissolução. Ajustar o pH final a 8,0 com solução de HCl 1M, transferir a solução para uma proveta e completar o volume para 1000mL. Autoclavar a 121°C por 15 minutos, deixar esfriar e estocar a 4°C.

TRITON X-100 2%

Objetivo:

Detergente comumente utilizado em processos de extração de DNA, pois permite a solubilização de membranas celulares.

Composição:

Triton X-100 2mL

TE q.s.p. 100mL

Preparo:

Misturar os reagentes e estocar a 28°C em um frasco protegido da luz. Se desejar, autoclavar a 121°C por 15 minutos.

SOLUÇÃO SALINA ACRESCIDA DE CLORANFENICOL PARA ISOLAMENTO DE *CRYPTOCOCCUS SPP.*

Objetivo:

Isolamento de *Cryptococcus spp.* a partir de amostras ambientais contaminadas.

Composição:

Cloreto de sódio 0,9 g

Água destilada 100 ml

Cloranfenicol 0,04g

Preparo:

Misturar a água destilada e o cloreto de sódio. Autoclavar e distribuir alíquotas de 10 ml em tubos de vidro com tampa de rosca.

MEIOS DE CULTURA

ÁGAR-BATATA

Objetivo:

Usado para realização de microcultivo de fungos filamentosos e estoque de cepas fúngicas.

Composição:

Infusão de batatas 500 ml

Dextrose 10 g

Ágar bacteriológico 15 g

Água destilada q.s.p. 1000 ml

Preparo:

Cozinhar 250 g de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) descascadas em 500 ml de água, por 1 hora. Filtrar a infusão de batatas através de gaze. Restituir o volume inicial de água (500 mL) e acrescentar 500 mL de água destilada. Adicionar o ágar e a dextrose, dissolvendo-os completamente. Autoclavar o meio, por 15 minutos, a 121 °C, e distribuir alíquotas de 4 mL em tubos de vidro. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm. Obs.: Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob as denominações: Ágar-batata (DIFCO), *Potato dextrose Agar* (OXOID) e *Agar-Pommede-Terre* (Sanofi-Institut Pasteur).

ÁGAR C.G.B. (CANAVANINA, GLICINA, AZUL DE BROMOTIMOL)

Objetivo:

Realizar a tipagem de *Cryptococcus neoformans*, diferindo a var. *neoformans*, que não consegue crescer nesse meio, da var. *gattii*, que se desenvolve bem na presença da glicina e modifica a cor do meio para azul-cobalto em 48 h-5 dias.

Composição:

Água destilada 880 mL

Solução B 20 mL

Solução A 100 mL

Ágar bacteriológico 20 g

Preparo:

Solução A

Glicina 10 g

Fosfato de potássio monobásico 1 g

Sulfato de magnésio 1 g

Sulfato de L-canavanina 30 mg

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Preparo:

Dissolver os ingredientes em um béquer e ajustar o pH para 5,6. Filtrar a solução com um filtro 0,22 µm. Distribuir alíquotas de 100 mL. Estocar em refrigerador.

Solução B

Azul de bromotimol 0,4 g

Hidróxido de sódio 0,01 N 64 mL

Água destilada 36 mL

Preparo da Solução de NaOH 0,01 N

NaOH 0,04g

Água destilada 100 mL

Preparo:

Dissolver o azul de bromotimol em NaOH e adicionar água. Acondicionar em frasco de cor âmbar e manter sob refrigeração. Dissolver completamente o ágar em água destilada. Adicionar a solução B. Autocalvar o meio, por 15 minutos, a 121 °C, e resfriar até 48°C. Acrescentar 100 mL da solução A, homogeneizar o meio e distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

ÁGAR-NÍGER

Objetivo:

Usado para identificação presuntiva de *Cryptococcus neoformans*, baseando-se na capacidade dessa espécie em produzir a enzima fenoloxidase quando em presença de tirosina e ácido clorogênico contido em algumas sementes, tais como a *Guizottia abyssinica*, fornecendo ao meio uma pigmentação castanha característica.

Composição:

Dextrose 10 g

Creatinina 780 mg

Clorafenicol 50 mg

Difenil 100 mg

Extrato de semente de niger 200 mL

Ágar bacteriológico 20 g

Água destilada 800 mL

Preparo:

Extrato de sementes de níger (*Guizottia Abyssinica*)

Pesar 70 g de sementes de níger pulverizadas em almofariz com pistilo. Suspender em 350 ml de água destilada. Autoclavar, durante 10 minutos, a 121°C. Filtrar através de gaze e acondicionar em frasco estéril. Dissolver o ágar em 800 ml de água destilada, aquecendo-o em banho-maria. Adicionar as demais substâncias, agitando para homogeneizar o meio. Autocalvar e distribuir em placas de Petri médias ou em tubos de ensaio. Acondicionar, sob refrigeração, até o momento do uso.

ÁGAR-SABOURAUD 2%

Objetivo:

É o principal meio de cultura usado nem micologia. Utiliza-se para o cultivo primário geral dos fungos (leveduras, filamentosos e alguns dimórficos), em especial para os dermatófitos, uma vez que as principais características macro e microscópicas desse grupamento fúngico são classicamente descritas a partir do seu crescimento nesse meio. A composição do ágar-Sabouraud foi, inicialmente, proposta de Raymond Sabouraud, em 1904, e vem apresentando inúmeras modificações com o passar dos anos, com alterações na quantidade de alguns componentes, tais como a dextrose e a adição de substâncias inibidoras, como clorafenicol e a cicloeximida.

Composição:

Peptona 10 g

Dextrose 40 g

Ágar bacteriológico 20 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Preparo:

Dissolver ágar, peptona e dextrose em água destilada, aquecendo em banho-maria. Autoclavar, por 15 minutos, a 121°C. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter um superfície de 6 cm.

ÁGAR-UREIA DE CHRISTENSEN'S

Objetivo:

Utilizado para diferenciar algumas espécies do gênero *Trichophyton*, como o *T. mentagrophytes* (que hidrolisa a ureia) e o *T. rubrum* (que não hidrolisa a ureia). É usado, ainda, para diferenciar as leveduras pertencentes aos filos Ascomycotina (p.ex., *Candida* sp., que não hidrolisa a ureia) e Basidiomycotina (p. ex., *Rhodotorula* sp. E *Malassezia* sp., que hidrolisam a ureia). Esse teste baseia-se na capacidade de determinadas espécies fúngicas de produzir enzima urease, a qual hidrolisa a ureia, liberando amônia e alcalinizando o meio, fazendo com que a coloração do meio passe do amarelo para o rosa-escuro.

Composição:

Solução A:

Ágar-base ureia (Christensen's) 29 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

Suspender o ágar-base ureia e, em água destilada, misturar até dissolver completamente. Esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 10 mL e manter sob refrigeração até o momento do uso.

Solução B:

Ágar bacteriológico 15 g

Água destilada 900 mL

Dissolver o ágar em água destilada. Distribuir alíquotas de 90 mL, em balões de vidro e esterilizar em autoclave, a 121°C, por 15 minutos.

Preparo:

Para preparar 100 mL de meio, é necessário fundir 90 ml da solução B, esperar esfriar até que a solução atinja aproximadamente 50°C e adicionar 10 mL da solução A. Homogeneizar bem a mistura e distribuir alíquotas de 1mL em tubos de ensaio estéreis. Deixar solidificar na posição inclinada. Obs. A leitura desse teste deve ser feita até 96 horas após semeado, uma vez que, em longo prazo, com o esgotamento do substrato do meio, os fungos morrem e, conseqüentemente, liberam metabólitos alcalinos que promoverão a viragem da coloração do meio, inutilizando a leitura.

ÁGAR FUBÁ (CORNMEAL TWEEN) 80**Objetivo:**

Realização de microcultivos de leveduras, pois permite a formação de estruturas como hifas, pseudo-hifas e blastoconídeos, que possibilitam a identificação do gênero, ou mesmo da espécie estudada. É utilizado principalmente para diferenciar espécies do gênero *Candida*.

Composição:

Fubá de milho 40g

Dextrose 10g

Ágar bacteriológico

Água destilada q.s.p 1000mL

Preparo:

Dissolver o fubá de milho em 500mL de água e ferver em banho-maria por aproximadamente 40 minutos. Deixar esfriar e filtrar com gaze. Em recipiente separado, dissolver o ágar bacteriológico em 500mL de água destilada e juntar com o extrato de fubá e o Tween 80. Homogeneizar e autoclavar por 15 minutos, a 121°C. Esse meio também pode ser adquirido comercialmente na forma desidratada sob a denominação de *Cornmeal* (DIFCO).

MEIO DE ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS (MEIO C)

Objetivo:

Analisar a capacidade das leveduras de assimilar diferentes carboidratos.

Composição:

Meio basal

Ágar bacteriológico 20 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Solução estoque de *Yeast Nitrogen Base*

Yeast Nitrogen Base (DIFCO) 6,7 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

Preparo:

Meio basal

Dissolver o ágar em água destilada, aquecendo-o em banho-maria. Autoclavar, por 15 minutos, a 121 °C. Distribuir alíquotas de 40 mL.

Solução estoque de *Yeast Nitrogen Base*

Dissolver o *Yeast Nitrogen Base* em 100 mL de água destilada e deionizada; esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 10 mL e estocar em frasco de cor âmbar na geladeira.

Preparo final do meio

Para cada alíquota de 40 mL do meio basal, acrescentar 0,4 mL da solução estoque de *Yeast Nitrogen Base*. Atenção: só acrescentar a solução de *Yeast Nitrogen Base* quando o meio basal estiver com a temperatura aproximada de 48 °C.

MEIO RPMI – MOPS

Objetivo:

Meio de cultura padronizado pelo NCCLS, para execução de testes de susceptibilidade a antifúngicos, mediante técnica da microdiluição em caldo (documento M-27 A2, 2002).

Composição:

RPMI 1640 (com glutamina e sem bicarbonato de sódio) 10,5 g

MOPS (ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico) 34,5 g

Clorafenicol 0,5 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Preparo:

Dissolver os componentes em água destilada. Ajustar o pH final para 7,0 (com solução de hidróxido de sódio 10 N). Homogeneizar e esterilizar o meio pro filtração. Manter sob refrigeração até o momento do uso. O meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e vitaminas, sendo quimicamente definido

e livre de macromoléculas. Esse meio é fornecido comercialmente, na forma desidratada, em pó ou líquido. Por ser higroscópico, deve ser protegido do meio ambiente, especialmente de lugares úmidos. Não são recomendadas preparações com concentrações maiores do que as preconizadas pelo fabricante, em razão da grande possibilidade de formação de precipitados.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)