

**Diversidade genética e suscetibilidade antifúngica de cepas
ambientais e clínicas de *Cryptococcus neoformans* e
Cryptococcus gattii no Brasil**

LUCIANA TRILLES

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas – IPEC/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor.

Orientadores: Prof. Dra. Márcia dos Santos Lazéra
Prof. Dr. Wieland Meyer

Rio de Janeiro – RJ
2008

T829 Trilles, Luciana

Diversidade genética e suscetibilidade antifúngica de cepas ambientais e clínicas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* no Brasil / Luciana Trilles. - Rio de Janeiro, 2008.

viii, 121f.: il.; 30cm.

Tese (doutorado) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2008.

Bibliografia: f. 111-121

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. *Cryptococcus gattii*. 3. Epidemiologia molecular. 4. Suscetibilidade Antifúngica. 5. "Rolling Circle Amplification". I. Título.

CDD 579.55

LUCIANA TRILLES

Diversidade genética e suscetibilidade antifúngica de cepas ambientais e clínicas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* no Brasil

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas – IPEC/FIOCRUZ, para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadores: Dra Márcia dos Santos Lazéra
Prof. Dr. Wieland Meyer

Aprovada em 12 de março de 2008

Banca examinadora

- Dra. Rosely Zancopé Oliveira (presidente) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) / FIOCRUZ
- Dra. Liane de Castro – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) / FIOCRUZ
- Ricardo Igreja – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) / UFRJ
- Cíntia de Moraes Borba – Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ
- Armando de Oliveira Schubach - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) / FIOCRUZ

Aos meus pais pelo apoio incondicional.

A Deus pelas oportunidades.

Agradecimentos:

À Márcia dos Santos Lazéra, após todos esses anos trabalhando juntas, não a vejo somente como orientadora, mas também como uma grande amiga, sabendo como ninguém orientar e direcionar minha tese.

Ao Wieland Meyer, primeiramente agradeço pelo convite para realizar uma parte importante da tese em seu laboratório, agradeço também pela amizade e paciência dispensada e por tentar me ensinar mais do que biologia molecular. Agradeço também aos seus estudantes e técnicos Alejandro, Sirada, Popchai, Krystyna, Nathalie e Clement pelo carinho, amizade e pela valiosa ajuda nos trabalhos de bancada na parte de biologia molecular.

Ao Josep Guarro pela oportunidade de aprender sobre sensibilidade antifúngica e realizar parte da tese em seu laboratório e, também, a seus estudantes Belkis, Montserrat Ortoneda e Carolina Serena pela amizade e conhecimentos compartilhados.

Ao Bodo Wanke pelo carinho e pelos valiosos ensinamentos de todos esses anos.

À Marília Martins Nishikawa pela realização dos testes bioquímicos para a identificação dos isolados, por estar sempre disposta a ajudar quando precisamos.

À Gláucia Gonçalves Barbosa pelo apoio constante no laboratório, pela grande amizade e paciência e, por aceitar a “queima de seus carmas” comigo.

À Cláudia, Bernardina, Gabi e Érika, agradeço o apoio e amizade.

À Fundação CAPES pelo apoio financeiro.

A todos, minha sincera gratidão.

RESUMO

A criptococose representa importante problema de saúde pública no Brasil. É micose de caráter sistêmico, causada por espécies do “complexo *Cryptococcus*”: *Cryptococcus neoformans* (Cn) e *Cryptococcus gattii* (Cg). Cn é cosmopolita, causando principalmente meningoencefalite em hospedeiros imunodeprimidos. Já Cg causa meningite e pneumonia fúngica em hospedeiros imunocompetentes de áreas tropicais e subtropicais, com expressiva letalidade no Brasil (56%). Técnicas moleculares permitem identificar espécies e os principais tipos moleculares destes agentes, VNI, VNII, VNIII, VNIV (Cn) e VGI, VGII, VGIII e VGIV (Cg). O tipo VNI é oportunista e predominante em todo mundo, associado a AIDS e outras condições de imunodepressão; VGI é o tipo molecular de Cg mais comum no mundo, porém VGII parece ser o mais virulento, sendo o agente da única epidemia de criptococose em humanos e animais já relatada, e que ainda se encontra em evolução no Canadá. O objetivo deste trabalho foi realizar estudo do perfil de sensibilidade antifúngica e genotípico de isolados brasileiros de Cn e Cg. O método de microdiluição em caldo foi utilizado para os testes de suscetibilidade antifúngica de 30 Cn e 57 Cg frente a 9 drogas. A tipagem molecular foi realizada por “PCR fingerprinting” e *URA5*-RFLP, o tipo sexuado foi determinado por PCR com primers específicos do gene de feromônio, e isolados atípicos foram caracterizados pela técnica de RCA (“Rolling Circle Amplification”). Cg demonstrou ser menos suscetível do que Cn frente a 7 das 9 drogas testadas. Testes *in vitro* de associação de micafungina com azóis demonstraram potencialização da atividade das drogas com possível aplicação em esquemas terapêuticos combinados. No Brasil, de 320 isolados Cn analisados, VNI predominou (88,4%), ocorrendo em todas as regiões, principalmente associado a AIDS. Com relação a 123 isolados Cg, predominou o tipo molecular VGII (74,8%), o principal agente da criptococose primária. Já o VGI, o mais comum no mundo, ocorreu somente nas regiões S e SE do país (12,2%). Considerando a recente emergência do VGII em regiões temperadas (Canadá), torna-se necessário o contínuo monitoramento regional dos tipos moleculares circulantes no Brasil, bem como a identificação de surtos de criptococose em humanos. Nova técnica molecular RCA, permitiu a rápida identificação de Cn e Cg, bem como distinção de alguns tipos moleculares e de isolados híbridos AD e possíveis híbridos AB.

ABSTRACT

Cryptococcosis, an important public health problem in Brazil, is a systemic mycosis caused by two species of the *Cryptococcus neoformans* complex: *Cryptococcus neoformans* (Cn) and *Cryptococcus gattii* (Cg). While Cn is cosmopolitan, causing meningoencephalitis mainly in immunocompromised hosts, Cg causes pneumonia and meningitis predominantly in immunocompetent hosts in tropical and subtropical areas, exhibiting high lethality rates in Brazil (56%). Both species and the 8 major molecular types, VNI, VNII, VNIII, VNIV (Cn) and VGI, VGII, VGIII, VGIV (Cg) can be identified by molecular techniques. VNI is opportunistic and predominates worldwide, associated to AIDS and other immunodeficiencies; VGI is the most common Cg molecular type, but VGII seems to be the most virulent and has been identified as the agent of the only reported human and animal outbreak of this mycosis, which is still ongoing in the Vancouver Island, Canada. The aim of this study is to determine the antifungal susceptibilities and the genotypes of Brazilian Cn and Cg isolates. Antifungal susceptibility tests of 30 Cn and 57 Cg against 9 drugs were carried out using the microdilution method. The molecular typing was performed by PCR fingerprinting and *URA5*-RFLP techniques. PCR using pheromone specific primers identified the mating types and atypical isolates were characterized by RCA ("Rolling Circle Amplification"). Cg showed to be less susceptible than Cn against 7 out of 9 drugs tested. Combination *in vitro* of micafungin with azoles showed synergy and thus, a possible therapeutical applicability. Out of the 320 Brazilian Cn isolates analyzed, VNI predominated (88.4%), occurring in all regions associated to AIDS. Among the 123 Cg isolates analyzed, VGII predominated (74.8%), being the principal agent of primary cryptococcosis by Cg in the N and NE regions of Brazil. Although VGI is the most common worldwide, it occurred only in the S and SE regions of the country (12.2%). Considering the recent VGII emergence in temperate climates (Canada), it is important to monitor continuously the regional pattern of molecular types present all over the country, allowing the identification of outbreaks of cryptococcosis. The new RCA molecular technique permitted quick identification of Cn and Cg, as well as distinguishing some molecular types and some AD hybrid isolates and possibly AB hybrids.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - HISTÓRICO DA CRIPTOCOCOSE	3
2.2 – TAXONOMIA	4
2.2.1 – Conceitos de Espécie	4
2.2.2 – Complexo de Espécies <i>Cryptococcus</i>	5
2.2.3 – Especiação	7
2.2.4 – Hibridação	8
2.3 – CICLO DE VIDA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES <i>CRYPTOCOCCUS</i>	9
2.4 – PATOGENIA	11
2.5 – EPIDEMIOLOGIA E ECOLOGIA	12
2.6 – FATORES DE VIRULÊNCIA	15
2.7 – SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA	17
2.7.1 – Drogas Antifúngicas	18
2.7.2 – Métodos de Suscetibilidade Antifúngica	20
2.8 – EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	21
3 – OBJETIVOS	26
4 - ARTIGO I	27
5 – ARTIGO II	38
6 – ARTIGO III	48
7 – ARTIGO IV	75
8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
9 – CONCLUSÕES	110
10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1 - INTRODUÇÃO

A criptococose representa importante problema de saúde pública no Brasil. É doença geradora de problema social grave devido a seqüelas incapacitantes, como a perda ou redução da visão e hidrocefalia (Rozembaum e col., 1992, Netto e col., 1993). A falta de conhecimento do espectro desta micose e as dificuldades laboratoriais levam a equívocos de diagnóstico ou diagnóstico tardio. Por outro lado, a criptococose não está sujeita a notificação compulsória o que implica no desconhecimento da magnitude do problema.

O presente trabalho é uma continuação e aprofundamento da pesquisa que resultou na Dissertação de Mestrado (Trilles, 2000), onde se iniciou a idéia de se aplicar ferramentas moleculares para a tipagem dos agentes da criptococose. Neste segundo trabalho, analisamos os dois agentes da criptococose, porém foi dada maior ênfase à espécie *C. gattii*, pois a mesma era considerada uma variedade dentro da espécie *C. neoformans*. Entretanto, muitas diferenças são observadas entre os dois microrganismos, inclusive de resposta clínica a tratamentos antifúngicos. Por ser mais comum, *C. neoformans* quase sempre serve de modelo de estudo da espécie, sendo que *C. gattii* permanece com o conhecimento restrito quanto à patogenicidade, fatores de virulência e sensibilidade antifúngica.

Desenvolvemos um estudo de enfoque nacional, para contribuir na melhor compreensão das características fenotípicas que envolvam fatores de patogenicidade de cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* de diversas regiões do Brasil, incluindo cepas de jovens e crianças da região do semi-árido e de transição para a Amazônia (Piauí e Maranhão) e identificar perfis de sensibilidade a vários antifúngicos em testes *in vitro*, além de comparar tais perfis fenotípicos aos genotípicos. Nossos trabalhos evidenciaram a presença de isolados ambientais de *C. neoformans* sorotipo D MATa relacionados a toca de tatu e a oco de cássia no Piauí. São achados raros e inéditos, objetos de publicações recentes, (Trilles e col., 2003; Nishikawa e col., 2003) e denotam peculiaridades regionais pouco conhecidas.

Optamos por apresentar a tese na forma de quatro artigos científicos, dois como primeira autora e dois como co-autora. Os artigos estão compilados dentro da formatação

exigida por cada um dos periódicos científicos em que foram publicados ou enviados para publicação.

2.- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- HISTÓRICO DA CRIPTOCOCOSE

A criptococose foi descrita pela primeira vez em 1894, a partir de caso humano com histórico de linfadenomegalia e úlcera tibial. Após visualização de leveduras em corte histológico, a doença foi denominada *Saccharomyces hominis*. O primeiro isolamento ambiental do agente da criptococose ocorreu no mesmo ano. A levedura foi isolada de suco de pêssego por Sanfelice, que pensou que tais leveduras pudessem produzir tumores cancerígenos, denominando o agente de *Saccharomyces neoformans*. Em 1896, Curtis identificou a levedura como *Megalococcus myxoides* a partir de um caso humano de infecção na virilha e posterior óbito por infecção do sistema nervoso central (SNC). Mais tarde, após experimentos com animais em laboratório, a levedura foi denominada *S. subcutaneous tumefaciens*, por terem sido visualizadas lesões granulomatosas em forma de tumores. Em 1901, Vuillemin renomeou o organismo como *Cryptococcus hominis*, pois não havia a formação de ascosporos como em *Saccharomyces* spp. Stoddard e Cuttler (1916) descreveram dois casos de meningite e, em análise de exames histopatológicos, foi visualizada região clara ao redor das leveduras, a qual foi interpretada como evidência de lise celular, o que fez com que o agente fosse denominado *Torula histolytica*. Em 1935, Benham realizou estudos de morfologia, fermentação, patologia e sorologia em numerosas leveduras, dentre as quais, 22 tinham sido identificadas como *Cryptococcus*, *Saccharomyces* e *Torula*. Tais leveduras foram renomeadas e reunidas em um só gênero e espécie, *C. hominis*, com duas variedades. Evans, em 1949, verificou diferenças na imunogenicidade de diferentes cepas, sendo identificados os sorotipos A, B e C. Por volta do ano de 1950, Benham propôs o nome *C. neoformans* como *nome conservandum*, tanto para isolados ambientais como para clínicos, encerrando a confusão em torno da terminologia até então usada para casos de criptococose, como doença de Busse-Buschke, blastomicose, torulose e saccharomicose. Em 1970, cepas atípicas de *C. neoformans* foram identificadas como uma nova variedade por Vanbreuseghem & Takashio, *C. neoformans* var. *gattii*. Até 1950, os relatos de criptococose aumentaram, em parte devido

ao maior conhecimento sobre o patógeno, mas principalmente pelo aumento da população imunocomprometida.

Progressivamente identificada como causa de pneumonia, meningoencefalite, assim como outras formas disseminadas, a criptococose foi reconhecida como importante infecção oportunista, relacionada a transplantes renais, linfomas e outras condições de imunodepressão celular (Rozenbaum & Gonçalves, 1992; Kwon-Chung e col., 1994), o que fez com que, na década de 80, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerasse a idéia de que a presença de meningite criptocócica seria suficiente para diagnosticar a AIDS (WHO, 1986).

A incidência da criptococose aumentou drasticamente nas últimas décadas como consequência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a qual tem contribuído para aproximadamente 80 a 90% dos casos de criptococose. Antes da introdução da terapia HAART, a criptococose ocorria em cerca de 5 a 30% dos casos de AIDS como infecção oportunística e como importante causa de letalidade, ao lado de toxoplasmose, pneumocistose e micobacterioses (Kovacs e col., 1985; Kwon-Chung & Bennett, 1992, Igreja e col., 2004). O histórico foi baseado em uma coletânea de dados dos seguintes livros: Kwon-Chung & Bennett, 1992; Casadevall & Perfect; 1998; Cox & Perfect 1998.

2.2- TAXONOMIA

A sistemática bem como a taxonomia dos fungos patogênicos possui grande importância, tanto acadêmica quanto prática, pois a posição exata dos fungos na classificação informa as características do microrganismo, permitindo encaminhar com maior confiabilidade o melhor esquema terapêutico ou profilático a ser utilizado. Porém, as opiniões diferem quanto à definição de espécie.

2.2.1- Conceitos de espécie

Tem havido muitas controvérsias quando o assunto é a quantidade de espécies dentro de *C. neoformans*, uma, duas, três ou até mesmo oito espécies, dependendo da opinião do taxonomista quanto à definição mais apropriada de espécie. Os conceitos de espécie mais comumente utilizados são: Conceito morfológico (fenotípico) de espécies (MSC); conceito

biológico de espécies (BSC); e conceito filogenético de espécie (PSC). A realidade é que todos os conceitos possuem vantagens e desvantagens. Na prática, o conceito mais utilizado para classificação dos fungos é o MSC, o qual se baseia na descrição das características morfológicas ou outras características fenotípicas, como termotolerância, produção de metabólitos secundários, presença de pigmentos. Utilizando MSC, as espécies podem ser reconhecidas mais facilmente, tanto organismos sexuados quanto assexuados, além de poder ser aplicada na identificação de espécies extintas. BSC define espécie como populações que se reproduzem entre si e são isoladas reprodutivamente dos outros grupos. Este conceito pode ser muito útil para o estudo de genética de população, porém, é aplicado apenas nos organismos com reprodução sexuada conhecida. PSC define espécie como menor agrupamento de indivíduos que estão interconectados por relações genéticas. PSC é o conceito que se aproxima mais do conceito evolucionário de espécies (ESC) que é definido pelo grupo de organismo que corresponde a uma linhagem monofilética, ou seja, que possui uma única origem evolucionária. PSC utiliza seqüências de DNA, que é a característica mais confiável, porém se torna subjetivo dependendo da região do DNA utilizada (Taylor e col., 2000; Kwon-Chung & Varma, 2006).

2.2.2- Complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*

O agente etiológico da criptococose, *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill., apresenta-se como levedura saprófita, haplóide, usualmente uni ou bibrotante, com forma esférica a oval, capsulada (Kozel, 1995) e produtora de melanina (Ikeda e col., 1993), ambos importantes fatores de virulência e patogenicidade (Kwon-Chung & Rhodes, 1986). Classicamente, são reconhecidas duas variedades dentro da espécie *C. neoformans* - *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) - as quais possuem diferenças fisiológicas, bioquímicas, epidemiológicas, sorológicas e morfológicas (Kwon-Chung & Bennett, 1984). Tanto na forma parasitária como na forma saprófita, *C. neoformans* é observado na sua fase vegetativa, normalmente haplóide, reproduzindo-se por brotamento (White & Armstrong, 1995). O estado perfeito de *C. neoformans* foi reproduzido *in vitro*, descrito como *Filobasidiella neoformans* por Kwon-Chung (1978) e incluído na família *Filobasidiaceae*. Devido a semelhanças na composição de ácidos graxos e em outras características fenotípicas, foi identificada uma relação taxonômica entre os gêneros *Cryptococcus* e *Tremella* (Smit e col., 1988). Tal semelhança entre os grupos

também foi verificada a partir do sequenciamento dos genes ribossomais 16S-like, 26S e 5S, onde espécies do gênero *Filobasidiella* eram mais próximas da família *Tremellaceae* do que com os outros membros da família *Filobasidiaceae* (Casadevall & Perfect, 1998).

A partir de experimentos *in vitro* realizados na década de 1980, foi sugerido a ocorrência de recombinantes férteis obtidos por cruzamento entre *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e var. *gattii* (sorotipo B), indicando que tais organismos fossem variedades e não espécies distintas (Kwon-Chung, Bennett & Rhodes, 1982; Schmeding, Jong & Hug, 1981), além do que, foi identificada grande similaridade entre o RNA ribossomal das duas variedades (Fan e col., 1994). Por outro lado, a taxa de reassociação DNA-DNA observada entre as duas variedades (55-63%) refletiu divergência genética intraespecífica (Aulakh, Straus & Kwon-Chung, 1981).

Recentemente, estudos genéticos e moleculares propuseram que as duas variedades deveriam ser reconhecidas como espécies distintas, *C. neoformans* (correspondendo aos sorotipos A, D e AD) e *C. gattii* (correspondendo aos sorotipos B e C) (Kwon-Chung e col., 2002). A proposta também se baseou nas diferenças morfológicas da fase teleomórfica, *F. neoformans* e *F. bacillispora* e pelas diferenças bioquímicas da fase anamórfica (vide quadro 1). Apesar da forma dos basidiósporos das duas espécies serem diferentes, a morfologia da fase de levedura não possui diferenças marcantes. Além do mais, o cruzamento entre *C. neoformans* e *C. gattii* pode gerar diplóides híbridos, mas não recombinantes verdadeiros haplóides (Kwon-Chung & Varma 2006). Independente da seqüência utilizada na correlação genética, pelo menos dois grandes e distintos grupamentos são claramente observados, um contendo os sorotipos A, D e AD, e outro com os sorotipos B e C (Fell e col., 2000; Xu e col., 2000; Diaz e col., 2006).

A diversidade observada entre os diferentes sorotipos de *C. neoformans* também gera discussões com relação à taxonomia. Grupamentos monofiléticos de cepas do sorotipo A e do sorotipo D geralmente se apresentam em grupamentos distintos, o que sugere que possam ser classificados em duas variedades – sorotipo A como var. *grubii* e sorotipo D como var. *neoformans* (Franzot e col., 1999). Porém, a classificação não confere quando análises filogenéticas são feitas utilizando a técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) ou sequenciamento de IGS+5S / RNAr+IGSII (Kwon-Chung & Varma, 2006). Além do mais, existe um número considerável de isolados híbridos no mundo que são

sorotipo AD, que ocorrem a partir do cruzamento do sorotipo A com sorotipo D (Kwon-Chung & Varma, 2006).

<p>Quadro 1. Classificação dos agentes da criptococose (Hibbett e col., 2007).</p>	
<p>Reino: Fungi</p>	
<p>Sub-reino: Dikarya</p>	
<p>Filo: Basidiomycota</p>	
<p>Sub-filo: <i>Agaricomycotina</i></p>	
<p>Classe: <i>Tremellomycetes</i></p>	
<p>Ordem: <i>Tremellales</i></p>	
<p>Família: <i>Filobasidiaceae</i></p>	
<p>Gênero: <i>Filobasidiella</i></p>	
<p>Teleomorfo</p>	<p>Anamorfo</p>
<p><i>Filobasidiella neoformans</i></p>	<p><i>Cryptococcus neoformans</i></p>
<p><i>Filobasidiella bacillispora</i></p>	<p><i>Cryptococcus gattii</i></p>

Em resumo, a classificação das duas espécies de *C. neoformans* tem se baseado no conceito de espécie fenotípico, bem como o biológico, os quais são confirmados pelo conceito filogenético de espécies.

2.2.3- Especiação

A especiação natural se inicia quando há o **isolamento reprodutivo** de uma subpopulação dentro de uma espécie, ocorrendo a diferenciação genotípica dos grupos. Há três modelos principais do processo evolutivo de especiação (pt.wikipedia.org/wiki/Especiação; www.icb.ufmg.br/lbem/aulas/grad/evol/especies/especie8.html):

- Especiação Alopátrica → Ocorre quando a população se divide e se isola geograficamente por mudanças geológicas e geomorfológicas, como vulcões, cursos d'água e cadeias montanhosas.
- Especiação Parapátrica → Não há isolamento geográfico completo, sendo mantido algum fluxo gênico entre as duas populações.
- Especiação Simpátrica → As populações divergem enquanto ocupam ainda a mesma área por adaptação a ambientes/nichos distintos, sendo que surge uma barreira biológica ao intercruzamento. Além do mais, a poliploidia e a hibridação ou hibridização de espécies diferentes podem levar à formação de fenótipos distintos.

Existem poucos trabalhos que utilizam métodos estatísticos de filogenia de fungos, incluindo estimativa de tempo de divergência. Hibridação parassexual já foi proposto para micorrizas do grupo Zygomycota e para *Allomyces* (Chytridiomycota) (Kohn, 2005). Em ascomicetos, alguns mecanismos influenciam no fluxo gênico das populações como diferenças do hospedeiro, domesticação, perda da habilidade de reproduzir sexuadamente e fungicidas. É difícil assegurar como o isolamento reprodutivo se desenvolve, pois a especiação é um processo lento e de difícil observação experimental. Nos fungos, esse isolamento pode ser pré-zigótico, no reconhecimento de gametas, ou pós-zigótico, na viabilidade dos híbridos resultantes do cruzamento. Le Gac e colaboradores (2007) realizou estudo experimental de isolamento reprodutivo utilizando o basidiomiceto fitopatogênico *Microbotryum violaceum* e verificou que a distância genética não influenciou a frequência de conjugação (isolamento pré-zigótico), porém, com aumento da distância genética foi observada a diminuição da viabilidade dos híbridos (isolamento pós-zigótico), fato também verificado em grupos de plantas e animais (Le Gac e col., 2007).

2.2.4- Hibridação

O termo hibridação natural, ou hibridização natural, pode ser definido como o cruzamento de duas populações que podem ser identificadas baseadas em uma ou mais características hereditárias e, híbridos, os indivíduos de tal cruzamento. Podem estar incluídos

nesta definição os híbridos que surgem de cruzamentos inter e intra-específicos e aqueles que surgem de uma fusão vegetativa (Olson & Stenlid, 2002).

Os fungos possuem um forte sistema genético para restringir a troca genética, tanto sexuada, como assexuada. O alo-reconhecimento permite que indivíduos com diferentes combinações dos alelos de incompatibilidade vegetativa sejam reconhecidos como “non-self”, desencadeando uma forte reação de incompatibilidade, que pode causar a morte celular. O sistema de tipo sexuado permite a existência de dois núcleos com tipos sexuais complementares, o que impede o autocruzamento e mantém a variação genética na população. Tipos sexuais com características parecidas podem ser encontrados em diferentes espécies, o que não impede a hibridação. Os resultados variam de uma F1 estéril a uma nova linhagem que pode se propagar sexualmente, sendo que pode ser produzido um novo táxon (Olson & Stenlid, 2002). Um exemplo de hibridação e formação de novo táxon foi relatado por Newcombe e colaboradores (2000). Foi realizado melhoramento genético do álamo, árvore utilizada para produção de celulose em regiões temperadas, com o objetivo de produzir linhagens resistentes ao fitopatógeno *Melampsora occidentalis*, alguns anos depois surge um novo patógeno com características morfológicas e patogênicas de *M. occidentalis* e *M. medusae*, sugerindo ser um híbrido natural das duas espécies.

Estudo recente analisou molecularmente isolados sorologicamente reativos para os sorotipos B e D do complexo de espécies *C. neoformans* e verificou que são na verdade isolados diplóides híbridos das duas espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (Bovers e col., 2006).

2.3- CICLO DE VIDA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*.

As espécies do complexo *C. neoformans* são heterotálicos e possuem um sistema de sexualidade bipolar com um locus e dois alelos, Mat **a** e Mat alfa. Estas leveduras representam o estado anamórfico de *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*. A fase teleomórfica é obtida através do cruzamento de duas cepas compatíveis Mat **a** e Mat alfa. Neste processo (Figura 1), há conjugação das duas células, alongamento e formação de micélio dicariótico com grampo de conexão e septo tipo doliporo, característico do filo Basidiomycota. Na extremidade da hifa, ocorre dilatação e formação do basídio, onde após a

meiose são formadas quatro cadeias de basidiósporos haplóides recombinantes (Kwon-Chung e col., 1982; Moore & Edman, 1993). Até o momento, a forma sexuada foi produzida somente *in vitro* em meio apropriado sendo jamais identificada em tecidos parasitados ou em natureza.

Existe um predomínio marcante de Mat alfa sobre o Mat **a** (30 a 40 vezes mais freqüente) em isolados clínicos e ambientais em diferentes regiões do mundo (Kwon-Chung e col., 1978, Madrenys e col., 1993), sendo ocasionalmente encontrados isolados diplóides auto-férteis (tipo sexuada alfa/a). O tipo sexuada alfa é o mais virulento em estudos animais, portanto, por sua relação com a virulência, torna-se importante a análise do ciclo sexuada deste fungo (Steenbergen & Casadevall, 2003). Sistemas de regulação vinculados ao cruzamento sexuada e capacidade de filamentação tem sido estudados como alvos potenciais futuros para terapêutica ou profilaxia da criptococose. Verificou-se que a produção de feromônio expressa por *C. neoformans* Mat alfa é fundamental para a ocorrência do ciclo sexuada entre cepas compatíveis (Steenbergen & Casadevall, 2003).

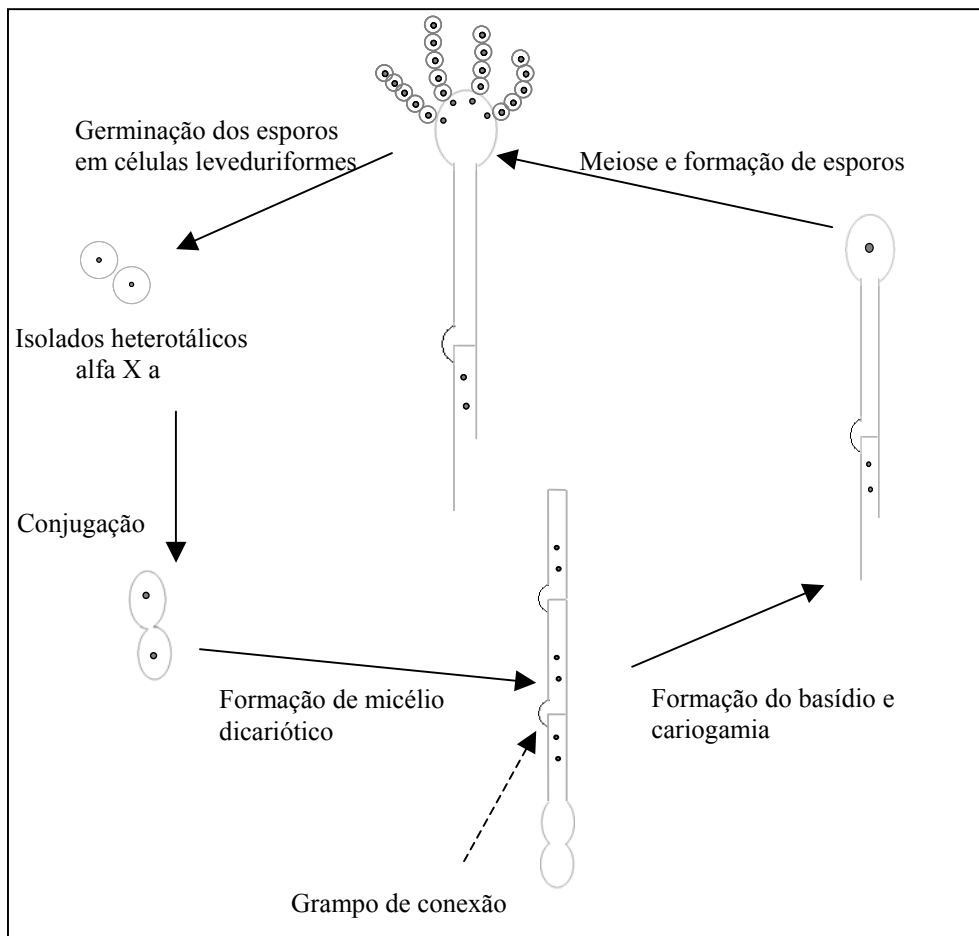


Figura 1. Desenho esquemático do ciclo sexuada de *C. neoformans* e *C. gattii*

Por outro lado, em condições *in vitro* de depleção de nitrogênio e baixo teor de água, pode ocorrer filamentação e produção de basídios e basidiósporos na ausência do outro tipo sexuado. Este fenômeno é denominado de frutificação haplóide ou monocariótica (Kwon-Chung e col., 1978), descrito para muitos basidiomicetos superiores, mas dentre os basidiomicetos inferiores, foi observado apenas em certos isolados de *C. neoformans* Mat alfa e Mat **a**, sendo independente do tipo sexuado, e controlada pelos genes *STE12* e *STE20* (Tscharke e col., 2003; Wickes e col., 1996). Tais genes codificam proteínas-kinase envolvidas na via de sinalização de produção de feromônio (Lengeler e col., 2000). Além do mais, esses genes, em determinadas condições, regulam a expressão de outras cujas funções são importantes para a virulência, como produção de melanina e de cápsula (Chang e col., 2001). Kwon-Chung e colaboradores (1999) realizaram sucessivos cruzamentos *in vitro* com cepas de *C. neoformans* Mat **a** e Mat alfa e foi observado que, ao contrário da taxa 1:1 esperada entre as progênes, a cada cruzamento, as progênes possuíam um cariótipo mais similar ao cariótipo parental Mat alfa, além da habilidade para o cruzamento declinar progressivamente. A oitava geração se tornou quase estéril, produzindo apenas basídios sem esporos. Tais achados levaram os autores a sugerirem que o ciclo de vida meiótico não é o principal meio de propagação do fungo. Além do mais, estudo ambiental recente realizado na Colômbia demonstrou a grande predominância do Mat **a** em relação ao Mat alfa em cepas de *C. gattii* (96.6%) (Escandón e col., 2006).

2.4 - PATOGENIA

Propágulos de *C. neoformans* e *C. gattii* do meio ambiente são inalados pelo mamífero hospedeiro e podem atingir os alvéolos pulmonares. Acredita-se que os propágulos potencialmente infecciosos são leveduras ressecadas, ou basidiósporos produzidos no ciclo sexuado, que possuem em torno de 3 µm de diâmetro, pois partículas maiores de 5 µm de diâmetro são normalmente retidas na árvore brônquica, não atingindo os alvéolos pulmonares, além dessas duas formas serem resistentes às condições ambientais (Zimmer e col., 1984). A doença pulmonar é mais freqüente em indivíduos imunocompetentes e os sintomas variam de quadros assintomáticos a pneumonias graves com insuficiência respiratória (Lazéra e col.,

2005). A partir dos alvéolos pulmonares, os propágulos podem disseminar via hematogênica para qualquer órgão ou sistema, desencadeando infecção sistêmica regressiva subclínica ou doença, sendo que os agentes possuem um tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) (Currie e col., 1994). Os quadros leves ou regressivos da infecção são provavelmente freqüentes devido à constante exposição do homem a esses agentes, porém não estão disponíveis testes cutâneos ou outros marcadores para a avaliação da infecção em populações (Mitchell & Perfect, 1995). Por outro lado, no curso da infecção primária, pode ocorrer também a reativação tardia de focos quiescentes. O quadro clínico da criptococose mais freqüentemente diagnosticado e principal causa de óbito da doença é a meningoencefalite, sendo que a infecção não se limita às meninges, podendo atingir também o córtex cerebral, tronco cerebral e cerebelo. Em seguida à meningoencefalite, pneumonia é a forma clínica mais diagnosticada e, com menor frequência, lesões de pele (Perfect, Magee & Magee, 1989).

2.5 - EPIDEMIOLOGIA E ECOLOGIA

A criptococose disseminada é freqüentemente diagnosticada em pacientes com comprometimento do sistema imunológico, principalmente AIDS, linfomas, leucemias e uso de corticóides, sendo *C. neoformans* sorotipo A o principal agente observado. O sorotipo A é cosmopolita e predomina como agente de doença oportunista, enquanto que *C. neoformans* sorotipo D é menos freqüente, sendo que apresenta prevalência significativa algumas regiões da Europa Central (Nurnburg e col., 1989; Dromer e col., 1996).

A prevalência da criptococose associada à AIDS varia desde 5 a 7% nos Estados Unidos e Europa, 10 a 15% no Brasil, até atingir 30% em países da África Central (Cooney, 2002). Como primeira infecção oportunista em AIDS, a prevalência da criptococose no Brasil varia de 23 a 48% (Pappalardo & Melhen 2003). Uma vez instalada, a infecção comporta-se neste grupo como doença de elevada morbi-mortalidade. Entretanto, a epidemiologia da criptococose associada à AIDS mudou consideravelmente nos grupos e países que têm acesso à terapia anti-retroviral combinada (Cooney, 2002).

C. neoformans é encontrado em vários substratos orgânicos, tendo sido estudado principalmente em ambientes urbanos, onde é clássica sua relação com habitat de aves. Já foi encontrado em suco de pêssego, leite, frutas, vegetais, madeira em decomposição e fezes de

aves, principalmente pombos (Gezuele e col., 1993; Lazéra e col., 1998). Estudos realizados na África (Swinne e col., 1994) e no Brasil (Passoni e col., 1998) evidenciaram elevados índices de contaminação da poeira domiciliar e peridomiciliar (13 a 50%), sugerindo que a exposição do homem ao fungo seja freqüente e faça parte de seu cotidiano. O habitat original da espécie tem sido objeto de investigação, principalmente aquele relacionado ao saprofitismo de substratos vegetais. *C. neoformans* e outros basidiomicetos foram encontrados em madeira parcialmente delignificada em florestas temperadas do Chile (Gonzáles e col., 1989). Nos últimos anos, tem sido demonstrado que ocos de árvores vivas também representam biótopos naturais para *C. neoformans*, que coloniza a madeira em decomposição desses microambientes, integrando uma sucessão de leveduras neste processo, podendo essa colonização ser um processo temporário ou permanente ao longo de pelo menos 15 anos (Lazéra e col., 1996; Barbosa e col., 2007). A fenol oxidase, enzima produzida por esta levedura, foi identificada como uma lacase (Willianson, 1994) e, lacases de basidiomicetos são implicados no processo de mineralização da lignina, importante polímero de carbono componente da madeira (Thurston, 1994).

C. gattii foi originalmente isolado em 1972, identificado em caso de meningoencefalite na África Central, em menino sem evidência de imunodepressão. Desde então observaram-se casos de localização extrapulmonar com meningoencefalite, lesões ósseas e cutâneas em quadros associados ou não, causados por *C. gattii* sorotipo B. Esses hospedeiros não apresentam evidência clara de imunodepressão celular e, são nativos de áreas tropicais e subtropicais (Kwon-Chung & Bennett, 1992). O habitat natural de *C. gattii* era desconhecido até 1990, quando foi isolado pela primeira vez de restos vegetais de *Eucalyptus camaldulensis* em floração na Austrália e posteriormente na Califórnia (Ellis & Pfeiffer, 1990, Pfeiffer & Ellis, 1992). A positividade correlacionava-se com o período de floração destas árvores, que foram consideradas hospedeiras do fungo e únicas fontes ambientais conhecidas. No Brasil, vários estudos em diferentes regiões demonstram que árvores tropicais nativas ou adaptadas de diferentes gêneros (oiti, ficus, cássia, guettarda, tento) são habitats naturais de *C. gattii*, e também que ambas as espécies ocorrem em uma mesma árvore, colonizando ocos com madeira em decomposição (Lazéra e col., 2000, Fortes e col., 2000; Trilles e col., 2003, Nishikawa e col., 2003). Estes microambientes representam um tipo de habitat natural onde ambas as espécies podem ocorrer em natureza, aspecto novo no conhecimento da ecologia deste fungo (Lazéra e col., 1996, 1998 e 2000).

No Meio-Norte (Maranhão e Piauí) do Brasil, um estudo retrospectivo de 124 casos de criptococose no Hospital de Doenças Infecto Contagiosas (HDIC), Teresina (PI), revelou que a grande maioria dos casos (88%) foi observada em hospedeiros imunocompetentes da região, com predomínio de *C. gattii* (92,5%). Neste grupo, chama a atenção a elevada letalidade (40,6%) e a ocorrência da micose em crianças e adolescentes até 19 anos (26%) (Martins, 2003). No Pará, a criptococose ocorre em menores de 13 anos, sem fator predisponente em 24% dos casos diagnosticados, com letalidade de 56% (Corrêa e col., 1999). Em Manaus, Amazonas, 18,7% dos casos foram diagnosticados em crianças de até 12 anos. Estes casos não estão relacionados à AIDS e, a grande maioria dessas crianças é nativa da região, moradora de áreas rurais (Santos, 2000). Em Roraima e Bahia, há dados indicando a ocorrência de criptococose primária, em crianças (Darzé e col., 2000; Fortes, 2001). Esses dados indicam que a criptococose por *C. gattii* ocorre de forma endêmica na região amazônica estendendo-se até o semi-árido nordestino em nosso país.

Ocasionalmente, *C. neoformans* é encontrado como comensal em humanos, mas é freqüentemente isolado da cavidade nasal de animais nativos e domésticos na Austrália, como cães, gatos e koalas. Por outro lado, *C. gattii* ainda não foi encontrado como comensal em humanos e, somente é encontrado como colonizador da cavidade nasal de cães com infecção ativa (Vilcins e col., 2002), mas também já foi encontrado como comensal em koalas na Austrália (Krockenberger e col., 2002). No Piauí, foi isolada uma cepa de *C. gattii* do baço de tatu aparentemente sadio em doença clínica (Trilles e col., 2003; Lazéra – comunicação pessoal). Tais animais podem estar funcionando como reservatórios e ajudando na disseminação do fungo.

Existem alguns registros de epidemias de criptococose animal devido ao *C. gattii*, epidemias essas que infectaram animais como cabras na Espanha (Baró, 1998) e psitacídeos em São Paulo, Brasil (Raso, 2004). Porém, a única epidemia humana e animal de criptococose teve início em 1999, na Ilha de Vancouver, no Canadá. Até 2006, foram diagnosticados mais de 100 casos humanos, com 6 óbitos, e também um grande número de cães, gatos, furões, lhamas e cetáceos (Stephen e col., 2002; Lindberg e col., 2007). Em sua grande maioria, são hospedeiros sem imunodepressão evidente, sendo *C. gattii* sorotipo B o agente das infecções. A ocorrência de tal epidemia numa região temperada, indica a ocorrência de uma mudança na distribuição de *C. gattii*, antes observado apenas em áreas tropicais e subtropicais (Kidd e col., 2004).

2.6 - FATORES DE VIRULÊNCIA

Virulência é a característica microbiana expressa apenas em hospedeiros susceptíveis. Apesar de não ser um parasita obrigatório, *C. neoformans* possui importantes fatores de virulência como cápsula polissacarídica, produção de melanina e a habilidade de crescer e multiplicar-se a 37-39°C, que são essenciais para a patogenicidade do fungo em mamíferos em geral. Diferentemente de muitas bactérias, o complexo *Cryptococcus* não produz substâncias tóxicas que influenciem diretamente nos sinais e sintomas da criptococose (Kozel, 1995). Estudo realizado com nematódio (*Caenorhabditis elegans*) e com ameba (*Acanthamoeba castellanii*) identificou um possível mecanismo pelo qual, a necessidade de sobreviver frente a predadores ambientais, resultou na aquisição e manutenção de características que funcionam como fatores de virulência em animais (Steenbergen & Casadevall, 2003).

A cápsula do complexo *C. neoformans* possui três principais componentes: manoproteínas, galactoxilomananas e glucuronoxilomanas (GXL), as quais definem os sorotipos de acordo com o tipo de ligação entre os açúcares manose e xilose. A cápsula de *C. neoformans*, além de possuir propriedades antifagocíticas, pode ser liberada pelo fungo em forma de vesículas no interior de macrófagos, podendo causar lise celular pela toxicidade (Vecchiarelli e col., 2000). O antígeno polissacáride GXL é o principal constituinte em termos de abundância e reatividade antigênica, acumula em fluidos corporais como soro, urina e líquido céfalo-raquidiano (LCR), cuja detecção é utilizada para diagnóstico da micose através de testes como aglutinação por partículas de látex e ELISA (ensaio de imunoabsorbância enzimática) (Richardson & Warnock, 1997). O polissacarídeo galactoxilomanana, é por sua vez constituído de manoproteínas e polímeros de galactoxilose, sendo encontrado em menor escala. Foi verificado que, ao transferir células de *C. neoformans* de cultivos *in vitro* para o estado parasitário, a parede celular e a cápsula aumentam de tamanho, ocorrendo também aumento de atividades enzimáticas, *e.g.*, fosfatase alcalina, que é detectada na cápsula *in vivo*, mas não *in vitro* (Takeo e col., 1973). O grau de aumento da espessura capsular, quando em parasitismo, varia de acordo com o órgão infectado, sendo essas mudanças de espessura

reversíveis (Rivera e col., 1998). As células do fungo produzem grande quantidade de cápsula em resposta à carência de ferro e à presença de alta concentração de CO₂ (Vartivarian e col., 1993), sendo que, normalmente, *C. neoformans* em natureza e em meio de cultura possui uma fina cápsula. Alguns genes relacionados com a produção de cápsula foram identificados e caracterizados; *CAP1*, *CAP2*, *CAS31*, *CAS1*, *UXS1*, *CAS32*, *CAS33*, *CAP64*, *CAP60*, *CAP59* e *CAP10* (Jung e col., 2006). A deleção de um desses genes pode resultar na produção de cepas acapsuladas e avirulentas (Chang & Kwon-Chung, 1994; Chang e col., 1996; Chang & Kwon-Chung, 1998).

Foi verificado que o glicolípido glicosilceramida (GlcCer), presente na parede celular, citoplasma e no interior de vesículas, é essencial para o crescimento de *C. neoformans* em pH alcalino, tanto *in vitro* como *in vivo*, e está associado à virulência na criptococose pulmonar. Os cerebrosídeos fúngicos, por serem extremamente conservados, representam um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos frente à *C. neoformans* (Rodrigues e col., 2007).

O complexo *Cryptococcus* sintetiza a melanina na presença de polifenóis ou diaminobenzenos, como L-DOPA, dopamina e epinefrina. A fenol-oxidase, enzima que cataliza o processo oxidativo na biossíntese da melanina de *C. neoformans*, foi caracterizada como uma lacase e é codificada pelo gene único *CNLAC1*, que tem a transcrição induzida pela carência de glicose (Williamson, 1994). A melanina é um radical livre estável que é insolúvel em solventes fisiológicos e resistente à degradação ácida. Está localizada na parede celular do fungo e protege a célula dos danos causados pela oxidação no interior dos macrófagos. Além do mais, o neurotropismo de *C. neoformans* pode ser, em parte, explicado pela habilidade do fungo utilizar neurotransmissores, como epinefrina e dopamina, como substratos para produção de melanina (Williamson e col., 1994). A melanina também pode influir nos resultados terapêuticos, já que células de *C. neoformans* com melanina são mais resistentes às drogas caspofingina e anfotericina B (van Duin e col., 2002). Além do mais, estudo recente verificou que as defesas antifúngicas das células hospedeiras de camundongos podem reduzir a efetividade da lacase de atingir a localização correta na parede celular durante a infecção pulmonar, mas não durante a infecção no cérebro, o que pode contribuir para uma atividade mais eficaz e predominante da enzima no órgão (Waterman e col., 2007).

A habilidade de crescer e multiplicar-se a 37-39°C é essencial para a infecção do hospedeiro humano e envolve um conjunto de características que estão presentes em todos os

fungos invasivos. Essas características podem ser alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas antifúngicas. No entanto, outros fatores de virulência, como produção de manitol e proteínas de estresse térmico (HSP), vêm sendo estudadas. A maioria das espécies de *Cryptococcus* e várias cepas de *C. neoformans* não são capazes de crescer à temperatura fisiológica humana, sendo, portanto, avirulentas. Em recentes trabalhos, foram identificadas as proteínas RAS1 e calcineurina como responsáveis, através de vias distintas, pelo crescimento de *C. neoformans* a altas temperaturas (Alspaugh e col., 2000).

Já foram identificados outros fatores de virulência em *C. neoformans* que são importantes para a infecção e patogenicidade. A fosfolipase, produzida pelo gene *PLB1*, hidroliza as ligações éster, destruindo a membrana fosfolipídica do hospedeiro (Ghannoum, 2000). As proteinases degradam proteínas do hospedeiro como colágeno, elastina e imunoglobulinas. Estudos em modelos animais sugerem que cepas MAT α sejam mais virulentas que cepas MAT β , bem como apresentem maior resistência *in vitro* (Madrenys e col., 1993), porém os fundamentos moleculares para essa diferença são desconhecidos.

Foram identificadas vias de sinalização que regulam a virulência e a morfogênese de *C. neoformans*: A via cAMP-PKA regula a produção de cápsula, de melanina e a reprodução sexual; a via MAP-kinase está relacionada com a ativação de feromônio. O funcionamento de ambas as vias de sinalização dependem de uma proteína receptora chamada proteína G, que é produzida pelo gene *GPAI* (Steenbergen e col., 2003).

O gene *CIR1* (*Cryptococcus* ferro-regulador) influencia funções de homeostase e transporte de ferro, e regula de forma positiva ou negativa diversos genes relacionados aos fatores de virulência, como produção de cápsula, de melanina, da fosfolipase e biossíntese de esteróis (Jung e col., 2006).

2.7 - SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Existem controvérsias a respeito da utilidade dos testes de suscetibilidade antifúngica na prática clínica. A maioria dos especialistas concorda que os testes não devem ser realizados em todos os casos. Outros especialistas afirmam que os testes deveriam ser realizados em todos os isolados de micose sistêmica, principalmente naqueles isolados de hemocultura ou de

biópsias de órgãos internos e, rotineiramente dos isolados oriundos de pacientes com falha terapêutica ou que receberam tratamento prévio com antifúngicos (Gadea e col., 2007).

2.7.1 - Drogas antifúngicas

Existem importantes inconvenientes para o desenvolvimento de drogas antifúngicas eficazes, sendo o principal deles o fato de que tanto o fungo como os tecidos do hospedeiro são constituídos de células eucariotas com características bioquímicas similares.

A maioria dos antifúngicos, comercializados ou em fase de experimentação, possui como alvo de ação o ergosterol, o qual é o composto majoritário da membrana fúngica. Entretanto, existem outros componentes estruturais da célula que são utilizados como alvo de ação de vários antifúngicos, como manana, quitina ou a β -(1,3)-D-glucana.

Uma das possíveis formas de classificar os diferentes compostos antifúngicos é pela sua estrutura química.

Derivados poliênicos: São antifúngicos produzidos por várias espécies de *Streptomyces*. O alvo desses compostos é o ergosterol da membrana fúngica. A interação dos polienos pelas ligações hidrofóbicas com os esteróis induz a formação de poros, o que leva a uma alteração da permeabilidade das células fúngicas com a perda de componentes citoplasmáticos, o que compromete a viabilidade do microrganismo. Um dos principais problemas no uso deste grupo de antifúngicos é sua elevada toxicidade renal e hepática (Girmenia e col., 2002).

Os compostos mais representativos desta família são a nistatina e a anfotericina B. A anfotericina B é obtida a partir de *Streptomyces nodosus* e foi comercializada para uso clínico em 1958. As leveduras possuem uma taxa de resistência baixa a este composto. Apesar de ser um composto de referência para o tratamento das micoses sistêmicas, sua nefrotoxicidade limita sua administração (Hsieh e col., 1998).

Para contornar o problema associado à sua toxicidade, foram criadas formulações lipídicas: anfotericina B em complexo lipídico (Abelcet[®]) e Anfotericina B lipossomal (AmBisome[®]). Estas formas lipídicas podem ser administradas a concentrações mais elevadas do que a fórmula tradicional, o que representa uma grande vantagem terapêutica (Stevens e col., 2000).

Compostos azólicos: Os azóis constituem uma das famílias de antifúngicos mais numerosas. Atuam como fungistáticos na célula fúngica, impedindo a síntese de ergosterol ao inibir a enzima lanosterol desmetilase. Com isso, ocorre um acúmulo dos precursores do ergosterol, alterando a estrutura e a função da membrana plasmática. Entretanto, antes do seu uso terapêutico, por reduzir a síntese de colesterol, deve ser levado em conta seus efeitos sobre o sistema endócrino e reprodutor, toxicidade hepática e renal, interação com múltiplos medicamentos, como rifampicina e antiretroviral e, contra-indicação na gravidez. Outra limitação do uso deste grupo de drogas é a aquisição de resistência e as baixas concentrações plasmáticas nos pacientes submetidos ao tratamento com os azóis.

Análogos de precursores de ácidos nucleicos: 5-fluorocitosina penetra na célula fúngica através de uma permease e, uma vez no citoplasma é alterada enzimaticamente se transformando em ácido 5-fluorodílico, que se incorpora no RNA interrompendo a síntese protéica. 5-fluorocitosina também pode ser transformada em 5-fluorodeoksiuridina monofosfato, inibidor da síntese de DNA e da divisão celular. Não pode ser usado como monoterapia devido à resistência primária e secundária, mas seu uso é indicado em combinação com anfotericina B como esquema de primeira escolha frente à meningite criptocócica (Mayanja-Kizza e col., 1998, Harrison, 2000).

Derivados peptídicos: Estes compostos possuem baixa toxicidade, já que atuam inibindo a síntese de mananas, quitina ou $\beta(1-3)$ -D-glucana, as quais não se encontram presentes nas células eucariotas humanas. Um exemplo desse grupo de antifúngicos é a nicomicina Z, ou polioxina, que são nucleosídeos que atuam inibindo a enzima quitina sintetase. Entretanto, seu espectro de ação se reduz a *Candida* spp e *Aspergillus* spp. Outros representantes do grupo, como a caspofungina (Merck Research Laboratoires) e micafungina (Fujisawa Healthcare Inc.), são seus análogos sintéticos e possuem espectro de ação semelhante (Del Poeta e col., 1997).

Alilaminas: Sua ação se deve ao bloqueio da síntese do ergosterol pela inibição da esqualeno epoxidase. O representante mais importante dessa família é a terbinafina (Novartis Pharmaceuticals). Por sua natureza altamente lipofílica, distribui-se principalmente no tecido cutâneo, adiposo e nas unhas (Elewski, 1998.), sendo utilizado principalmente no tratamento de dermatomicoses.

Com o aumento da prevalência das infecções fúngicas, houve uma busca mais intensa por novos agentes antifúngicos. O tratamento da criptococose ainda é baseado em anfotericina B, associada ou não à 5-fluorocitosina, para tratamento de indução e, fluconazol ou itraconazol para tratamento de manutenção. O uso prolongado de fluconazol como terapia de manutenção em pacientes com AIDS tem gerado discussão sobre a possibilidade do surgimento de cepas menos susceptíveis (Brandt e col., 2001). Ultimamente, para contornar os problemas de não resposta clínica frente aos tratamentos com os antifúngicos classicamente utilizados, novas drogas antifúngicas estão sendo estudadas, como posaconazol, voriconazol, ravuconazol e albaconazol, sendo que os dois últimos ainda estão em fase de desenvolvimento.

2.7.2 - Métodos de Suscetibilidade Antifúngica

Em 1982, o “National Committee for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS), EUA, hoje CLSI (“Clinical and Laboratory Standard Institute”), criou um subcomitê para a padronização dos testes de sensibilidade a antifúngicos com o objetivo de unificar os critérios metodológicos, primeiro com as leveduras (documento M27-A2, 2002) e mais tarde com os fungos filamentosos (documento M38-A, 2002). Ambos os documentos propõem o método de microdiluição em meio líquido e estabelecem as variáveis experimentais críticas para os testes *in vitro*. Os protocolos do CLSI são aceitos universalmente como método de referência para testes de susceptibilidade fúngica.

Além de estudos epidemiológicos, os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* têm como objetivo ajudar na escolha da melhor alternativa terapêutica em curto espaço de tempo. Em 2004 foi publicado documento pelo CLSI o qual descreve metodologia para testes de difusão em ágar para *Candida* spp, metodologia esta mais rápida e simples que a metodologia de diluição em caldo. Entre os métodos comerciais que podem ser empregados num laboratório clínico estão os métodos de difusão em disco ou fita como o NeoSensitabs (A/S Rosco) e o E-test (AB Biodisk). Também existem alguns kits comerciais que adaptaram a técnica de microdiluição em caldo como o Fungitest (Bio-Rad), Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems Ltd.), ATB Fungus 2 (BioMérieux) e o PASCO (Becton-Dickinson).

Não há ainda consenso a respeito de quais devem ser os pontos de corte para considerar uma cepa de *Cryptococcus* sp. sensível ou resistente aos diferentes compostos

antifúngicos, pois existem poucos estudos que correlacionem estudos *in vitro* com resposta terapêutica *in vivo*. Acredita-se que uma cepa sensível *in vitro* não significa êxito terapêutico, entretanto, aceita-se que um valor elevado de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de um determinado antifúngico pode indicar uma possível falha terapêutica (Rex e col., 1993). Os pontos de corte para interpretação de resultados só foram estabelecidos para algumas drogas, como fluconazol, itraconazol e fluorocitosina para espécies de *Candida* spp (documento M27-A2).

Classicamente, a criptococose é conhecida por atingir principalmente hospedeiros imunocomprometidos. Provavelmente por esse motivo, a maioria dos estudos, tanto fenotípicos como genotípicos, dos agentes da criptococose se concentra na espécie *C. neoformans*, sendo que muitas vezes a espécie (*C. neoformans* ou *C. gattii*) não é determinada no laboratório clínico. *C. neoformans* e *C. gattii* possuem diferenças bioquímicas, epidemiológicas, fisiológicas e ecológicas. Além do mais, tem-se observado que criptococose por *C. gattii* tem maior tendência à formação de criptocomas e um maior índice de recaídas do que infecções por *C. neoformans* (Lazéra e col., 2005; Harrison, 2000). Apesar das diferenças, a primeira escolha no tratamento para criptococose por ambas as espécies é o mesmo, anfotericina preferencialmente associado a 5-flucitosina na fase de indução e fluconazol na de manutenção.

A grande maioria dos trabalhos de suscetibilidade antifúngica ou correlação clínica está voltada para isolados clínicos ou ambientais de *C. neoformans* (Dannaoui e col., 2006; Dias e col., 2006; Larsen e col., 2007; Aller e col., 2007). Existem poucos estudos que retratam a sensibilidade antifúngica de *C. gattii*, sendo que trabalhos mais recentes determinaram a suscetibilidade de *C. gattii* frente a novas drogas como albaconazol e voriconazol (Morera-López e col., 2005; Khan e col., 2007).

2.8 - EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Estudos moleculares vêm sendo utilizados para ajudar na maior compreensão do fungo e seu comportamento. Durante a década de 80, as técnicas moleculares complementaram a anatomia, morfologia, embriologia e fisiologia comparativa, incluindo a análise de componentes químicos e, principalmente a caracterização de macromoléculas. O

desenvolvimento de marcadores moleculares, os quais são baseados em polimorfismos encontrados em proteínas ou DNA, contribuiu para a pesquisa em várias disciplinas como taxonomia, filogenia, ecologia e genética (Weising e col., 1995). Nas últimas décadas, a molécula de DNA tem sido o principal alvo de estudo quando se necessita de informações a respeito de polimorfismos, pois a seqüência é única para cada indivíduo e essa seqüência pode ser explorada para estudo de diversidade genética e correlação entre indivíduos (Weising e col., 1995).

A técnica que utiliza eletroforese em campo pulsado permite a separação de macromoléculas, facilitando o estudo dos cromossomos. Com isso, foi visto que *C. neoformans* tem aproximadamente 23Mb. O número de cromossomos de *C. gattii* varia de 9 a 14, tendo como número mais freqüente 13 cromossomos. O número mais encontrado em *C. neoformans* é de 12 cromossomos, podendo variar de 9 a 15 (Wickes, Moore & Kwon-Chung, 1994). *C. neoformans* e *C. gattii* possuem mecanismos que permitem alterações cromossomiais na natureza, possibilitando uma instabilidade contínua do genoma (Perfect e col., 1993). Tais alterações podem ser consequência de não-disjunção cromossomial dando origem a aneuplóides. O sequenciamento do genoma completo de *C. neoformans* demonstrou grande quantidade de transposons em todo genoma, sendo a maioria deles localizada em regiões centroméricas, o que pode levar à instabilidade cariotípica e fenotípica (Loftus e col., 2007).

O uso de ferramentas de biologia molecular para estudos epidemiológicos é importante para a compreensão da dinâmica de um microrganismo patogênico na população humana, para decifrar a complexa relação entre comensalismo e infecção, identificar a origem de uma infecção, monitorar o surgimento de cepas resistentes a antifúngicos e mesmo para identificar novos alvos antigênicos para ação de futuras vacinas (Soll, 2000).

Técnicas moleculares têm sido utilizadas para o estudo da epidemiologia do complexo de espécies *C. neoformans* com bons resultados, como DNA-*fingerprinting*, RFLP (“restriction fragment length polymorphisms”), cariotipagem (Wickes e col., 1994) e sequenciamento de região intergênica do RNAr (IGS) (Diaz e col., 2000).

Estudo realizado com cepas provenientes do Rio de Janeiro (RJ) e de Belo Horizonte (MG) e, cepas de Nova York, com as técnicas de cariotipagem, RFLP e sequenciamento do gene *URA5*, sugere uma dispersão global, predominantemente clonal, de cepas de sorotipo A,

apontando para a ocorrência de isolados de ambos os países bastante similares do ponto de vista genético (Franzot e col., 1997). Este caráter mundial de dispersão clonal do principal sorotipo relacionado a formas oportunistas da criptococose foi observado em outros trabalhos (Meyer e col., 1999 e 2003, Boekhout e col., 1997). Foi realizado um estudo de diversidade dos isolados brasileiros de origem clínica e ambiental, principalmente isolados de ocos de árvores, de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizando a técnica de DNA-*fingerprinting*, o qual reafirmou a dispersão clonal de *C. neoformans*, entretanto, demonstrou uma maior heterogeneidade entre os isolados de *C. gattii*. O trabalho também identificou genótipos idênticos entre isolados clínicos e ambientais sugerindo o oco de árvore como possível fonte de infecção humana nas regiões estudadas (Trilles, 2000).

O uso da técnica de AFLP (“Amplified-Fragment Length Polymorphism”) tem demonstrado bastante eficiência em estudos de diversidade genética e de taxonomia de bactérias, fungos, plantas e animais. Em resumo, a técnica consiste no corte do DNA total com enzimas de restrição, seguido pela amplificação pré-seletiva dos fragmentos ligados a adaptadores e de uma segunda amplificação mais seletiva do que a anterior (Borst e col., 2003). Apesar de inicialmente mais laboriosa do que outra técnica baseada em PCR, a quantidade de informações pode ser estendida com a utilização dos múltiplos pares de primers (iniciadores) que podem ser usados em uma mesma reação digestão/ligação, além da alta reprodutibilidade do método (Lopes e col., 1999).

Boekhout e colaboradores (Boekhout e col., 2001), utilizando a técnica de AFLP, identificaram seis linhagens distintas, três para *C. neoformans* e três para *C. gattii*. Em cada um desses grupos, uma das linhagens aparentemente representa cepas híbridas, mas não foram encontrados perfis recombinantes entre as variedades, reafirmando a idéia de trabalhos anteriores de que pelo menos duas espécies fazem parte deste complexo que engloba grupos monofiléticos distintos, sem fluxo gênico entre si. Quanto ao modo reprodutivo, diferente dos trabalhos anteriores, este grupo sugeriu que tanto a recombinação como a expansão clonal fazem parte da estratégia de reprodução e adaptação do fungo. Em trabalho recente de nosso grupo em colaboração com Dr. Boekhout, CBS, Holanda (Trilles e col., 2003), no qual foi utilizada a técnica de AFLP para a análise da diversidade de cepas isoladas de ocos de árvores, foi verificado que a expansão clonal de *C. neoformans* pode ocorrer numa única árvore e que isolados de árvores vizinhas podem ser geneticamente similares, sugerindo que a população de *Cryptococcus* pode ser clonalmente dispersada na região. Tanaka e col. (2003),

realizaram estudo de variabilidade na população F1 resultante do cruzamento de cepa sorotipo D MATa e cepa sorotipo A MATalpha. Em tal estudo não foi observada recombinação de tipo sexuado com sorotipo, sugerindo que ambos estão vinculados a genes que se encontram no mesmo cromossomo. Entretanto, estes são dados preliminares, pois F2 não foi analisada.

Esses aspectos da reprodução, gerando variabilidade, seja por recombinação sexuada, parassexualidade ou mutação, são fundamentais para o entendimento da produção de genótipos virulentos, da suscetibilidade a drogas e da relação parasita-hospedeiro.

Sorotipagem já foi amplamente utilizada para estudos epidemiológicos de *C. neoformans* e *C. gattii* (Nishikawa e col., 2003), porém, a falta de kit comercial no mercado fez com que houvesse aumento na utilização de ferramentas moleculares. Estudos de tipagem molecular dos agentes da criptococose têm utilizado diferentes métodos em amplas séries de isolados de origem humana, animal e ambiental, como PCR-fingerprinting (com iniciador M13 e [GACA]₄) e RFLP dos genes *URA5* e *PLB1* segundo Meyer e col. (1999, 2003) e, AFLP, segundo Boekhout e col. (2001). Comparados, estes métodos mostram boa correspondência entre si, bem como relação com sorotipos: *C. neoformans* (VN1/AFLP1, sorotipo A; VNII/AFLP1A, sorotipoA; VNIII/AFLP3, sorotipo AD; VNIV/AFLP2, sorotipo D); *C. gattii* (VG1/AFLP4, VGII/AFLP6. VGIII/AFLP5, VGIV/AFLP7, sorotipos B ou C) (Kidd e col., 2004).

Existem alguns trabalhos de tipagem molecular utilizando as metodologias citadas acima, sendo que os tipos VNI (para *C. neoformans*) e VGI (para *C. gattii*) predominam no mundo como agentes de criptococose (Ellis e col., 2000). Porém, na América Latina, a distribuição e ocorrência de tipos moleculares de *C. gattii* mostra-se diferente dos demais continentes (Meyer e col., 2003; Trilles e col., 2003). Estudo realizado com isolados de países iberoamericanos identificou o tipo molecular VGIII como sendo o tipo circulante mais comum de *C. gattii* na América do Sul (Meyer e col., 2003). Igreja e colaboradores (2004), em estudo de isolados seriados com a utilização de PCR-fingerprinting e RAPD, verificaram que é rara a infecção devido a mais de uma cepa, sendo a criptococose persistente conseqüência de recaída na grande maioria das vezes, porém foi identificado um caso de infecção múltipla por *C. neoformans* e *C. gattii*. Estudos mais recentes no Brasil identificaram em amostras clínicas os tipos VNI e VNII, e em amostras ambientais VNI e VGI (Abegg e col., 2006; Matsumoto e col., 2007). Foi verificado que o agente da epidemia da Ilha de

Vancouver, Canadá, é o VGII, sendo que os isolados, tanto clínicos como ambientais da região, apresentam grande similaridade genética (Kidd e col., 2004).

Apesar da tipagem VN/VG estar sendo bastante utilizada nos últimos anos, ainda não há um método de genotipagem universalmente aceito, o que é fundamental para conseguir um prognóstico preciso da emergência de cepas altamente virulentas no mundo.

Uma metodologia reprodutível e com grande poder de identificar polimorfismos é o SSRs (“Short Tandem Repeats”) ou microsátélites. SSRs é capaz de detectar seqüência de repetições de 1 a 6 pares de bases, sendo que o número de repetições freqüentemente varia entre indivíduos, dentro de uma mesma população ou entre espécies diferentes (Karaoglu e col., 2005). Outra metodologia recente com alto grau de especificidade e que favorece a genotipagem e a detecção de mutações é o “Rolling Circle Amplification” (RCA) com a utilização de sondas “Padlock”, as quais possuem dois segmentos nas extremidades complementares à seqüência alvo, que são conectadas por uma ligase (Nilsson e col., 1994; Demidov, 2002). Tal metodologia tem grande potencial para o diagnóstico e tem sido utilizada para a identificação das espécies de *Trichophyton* spp., apesar da pouca variação genética entre elas (de 3 a 4 pares de bases na região ITS) (Kong e col., 2008).

3.- OBJETIVOS

1. Avaliar e comparar a atividade *in vitro* dos antifúngicos tradicionais e dos novos azóis, como voriconazol, ravuconazol e albaconazol, frente a cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*.
2. Avaliar a suscetibilidade de várias espécies de *Cryptococcus* spp. frente a micafungina associada à anfotericina B e a azóis.
3. Avaliar a aplicação de nova técnica molecular, “rolling circle amplification” (RCA), na identificação *C. neoformans* e *C. gattii*.
4. Determinar o tipo sexuado (gene de feromônio) de *Filobasidiella neoformans*, como fator de virulência, de casos humanos de criptococose e de diferentes fontes sapróbias ambientais deste agente no Brasil.
5. Analisar a variabilidade genética das cepas brasileiras de *C. neoformans* e *C. gattii* relacionando-as com os padrões determinados.
6. Caracterizar os genótipos e correlacioná-los com diferentes fenótipos, biótopos, fontes ambientais e regiões geográficas no Brasil.

4 - ARTIGO I

In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*.

Publicado na revista *Journal of Clinical Microbiology* em outubro de 2004, vol. 42 (10), p. 4815-4817.

Este primeiro artigo retrata os perfis de sensibilidade de *C. gattii* frente a vários antifúngicos em testes *in vitro*, antifúngicos como anfotericina B, fluconazol, itraconazol, flucitosina, cetoconazol, voriconazol, ravuconazol, albaconazol e micafungina. Além de realizar uma comparação da sensibilidade entre *C. neoformans* e *C. gattii*.

In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*

Luciana Trilles¹, Belkys Fernández-Torres², Márcia dos Santos Lazéra¹,
Bodo Wanke¹, and Josep Guarro^{2*}

Serviço de Micologia Médica, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil¹, and Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain²

Received 3 March 2004/Returned for modification 3 May 2004/Accepted 12 June 2004

Abstract

We have determined the in vitro susceptibilities of 57 strains of *Cryptococcus gattii* to nine antifungal agents and have compared the MICs for these strains with those for *C. neoformans*. MICs were determined by a microdilution reference method. Albaconazole and ravuconazole (MICs of 0.04 and 0.05 µg/ml, respectively) showed the best activities. Micafungin showed no activity (MIC of > 128 µg/ml). In general, *C. gattii* was less susceptible than *C. neoformans* to all drugs tested, with the exception of amphotericin B and flucytosine.

Cryptococcosis is a relevant human infection generally associated with high mortality. *Cryptococcus neoformans*, the responsible agent, has been traditionally classified into two varieties, *C. neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *gattii*. However, recent molecular studies have indicated that the two varieties should be recognized as separate species, *C. neoformans* and *C. gattii* (4, 8). Although both affect the lungs and central nervous system, the infections caused by the two species have important differences in epidemiologies, clinical presentations, and therapeutic outcomes (7, 18). *C. neoformans* causes infections worldwide, mainly in immunocompromised hosts. By contrast, *C. gattii* is geographically restricted to tropical and subtropical regions and affects mainly immunocompetent hosts (3, 19). In the north and northeast regions of Brazil, *C. gattii* is endemic, prevailing in 62.7% of the cryptococcosis cases (14). Also, infections caused by *C. gattii* seem to have poorer responses to antifungal therapy than those caused by *C. neoformans* (22). Despite these differences, only *C. neoformans* has been included in the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (13) for

testing yeast. Some studies on the in vitro antifungal susceptibility of *C. neoformans* have been performed (11, 16, 21), but scarce data exist on the other species. Only a few strains of *C. gattii* have been tested up to now. Also, the results of these studies have been very contradictory (1, 12, 22). The aim of our study, therefore, was to determine the in vitro activities of nine agents against a large number of isolates of *C. gattii* from clinical and environmental origins and to compare the results with those for *C. neoformans*.

Eighty-seven strains of *Cryptococcus* spp. were selected for testing. Among these were 57 strains of *C. gattii* (52 of clinical origin and 5 of environmental origin) and 30 of *C. neoformans* (23 of clinical origin and 7 of environmental origin). The clinical strains were from patients with cryptococcal meningitis and were isolated in the north, northeast, southeast, and central regions of Brazil and maintained at FIOCRUZ (IPEC/INCQS) Culture Collection, Rio de Janeiro, Brazil. Species identification was performed by using standard methods (9). All isolates were maintained in 20% skim milk at -20°C until the study was performed. Prior to testing, each isolate was subcultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) to ensure optimal growth. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258 were used as quality control strains and included each time that a set of isolates was tested. MIC ranges were within the control limits recommended by the NCCLS (13). Ranges of MICs of albaconazole (ABC) and micafungin (MFG) were as follows: 0.1 and 16 to >16 µg/ml, respectively, for *C. parapsilosis* and 0.06 to 0.125 and 2 to 4 µg/ml, respectively, for *C. krusei*.

ABC (J. Uriach & Co, S.A., Barcelona, Spain), amphotericin B (AMB; E. R. Squibb & Sons, Barcelona, Spain), flucytosine (5FC; Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), fluconazole (FLC; Pfizer, Madrid, Spain), itraconazole (ITC) and ketoconazole (KTC; Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium), MFG (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan), ravuconazole (RVC; Bristol-Myers Squibb Company, New Brunswick, N.J.), and voriconazole (VRC; Pfizer, Madrid, Spain) were obtained as assay powders. Stock solutions (all drugs) were prepared in dimethyl sulfoxide, with the exception of those of 5FC, FLC, and MFG, which were prepared in water. Serial twofold dilutions were performed as described by the NCCLS (13). Final dilutions were made in RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid buffer (Sigma, Madrid, Spain). Aliquots (100 µl) of each antifungal agent at twice the final concentration were dispensed into the wells of microdilution trays. The microplates were stored at -70°C until used. The final

concentrations of the drugs ranged from 0.25 to 128 $\mu\text{g/ml}$ for MFG, from 0.125 to 64 $\mu\text{g/ml}$ for 5FC and FLC, and from 0.03 to 16 $\mu\text{g/ml}$ for all remaining agents.

A broth microdilution method for MIC determination was carried out as described in NCCLS document M27-A2 (13). Stock inoculum suspensions were prepared from 48-h-old cultures grown on SDA at 35°C. The suspensions were adjusted to a cell density that ranged from 1.0×10^6 to 5.0×10^6 cells/ml. Each suspension was diluted 1:50 and further diluted 1:20 in RPMI 1640 medium. An aliquot of 0.1 ml was added to each well of the microdilution tray to obtain a final inoculum concentration of 0.5×10^3 to 2.0×10^3 CFU/ml, as demonstrated by quantitative colony counts on SDA. Growth and sterility control wells were included for each isolate tested. The microplates were incubated at 35°C. The MIC endpoints were read after 48 and 72 h of incubation. The MIC of AMB was defined as the lowest concentration that produced 100% inhibition of growth, and the MICs of the other antifungal drugs were defined as the lowest concentrations that produced an 80% reduction in growth. After the MIC was measured, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined as described by other authors (5, 15). The microplates were shaken, and 10 μl from each well that showed complete inhibition (100% inhibition or an optically clear well) relative to the last positive well and the growth control (drug-free medium) was cultured on SDA plates at 35°C. The MFC was defined as the lowest drug concentration at which there was either no growth or fewer than three colonies. This parameter represents killing of approximately 99% of the original inoculum. Both on- and off-scale MICs and MFCs were included in the analysis. The high off-scale results were converted to the next highest concentration, and the low off-scale results were left unchanged. To facilitate the comparison of the activities of the drugs, geometric mean MICs and geometric mean MFCs were determined for each drug-isolate combination. Also, to determine the difference between in vitro fungistatic and fungicidal activities, each MFC was compared to the corresponding MIC for each isolate-drug combination. Comparisons of proportions were performed by using the Wilcoxon test or the Mann-Whitney test as appropriate and the statistical SPSS package (version 10.0). *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

All isolates produced clearly visible growth only after 72 h of incubation. We could not read the MIC endpoint clearly at 48 h because the growth in all isolates was insufficient. Table 1 shows the MICs of the drugs tested. When all the strains of the two species were considered together, the widest ranges of MICs were those of 5FC (0.5 to $>64 \mu\text{g/ml}$) and

FLC (1 to 64 µg/ml) and the narrowest range was that of the MICs of AMB (0.25 to 2 µg/ml). Although AMB, ITC, KTC, and VRC showed good activity, the two new triazoles ABC and RVC (MICs of 0.04 and 0.05 µg/ml, respectively) were more active than the other drugs tested ($P < 0.05$). On the other hand, MFG was the least active (MIC of >128 µg/ml). In general, *C.gattii* was less susceptible than *C. neoformans* to all the drugs tested ($P < 0.05$). The only exceptions were for AMB and 5FC, because the results between the two species were not significantly different. Table 2 shows the MFCs of the eight antifungal agents for 87 strains tested. For all isolates, the MFCs of AMB were either the same as or less than two dilutions higher than the MICs. In contrast, the MFCs of the other drugs for all isolates were much higher than the MICs, which may indicate that the other antifungal agents have fungistatic activity.

Because infections caused by *C. gattii* often have a worse prognosis than those caused by *C. neoformans* (18), and because in general these infections are not well studied, there is a critical need to determinate the in vitro susceptibility of *C. gattii* mainly to the new antifungal agents. To our knowledge, this is the first time that more than 21 strains of *C. gattii* have been tested.

Currently, AMB alone or in combination with 5FC remains the drug of choice for the treatment of cryptococcal meningitis, although FLC and ITC are also frequently used (17). In our study, we did not observe strains that were apparently resistant to AMB; in general, MICs for all isolates tested were ≤ 1 µg/ml (MICs for only two strains were 2 µg/ml). Similar results have been obtained by other authors (6, 11, 24) also using RPMI 1640 medium as the culture medium. However, strains resistant to AMB have been detected using antibiotic medium 3 (10). Although it is well known that FLC is more effective in vivo than ITC, several in vitro studies have reported opposite results (6, 16, 20). In our case, FLC also showed higher mean MICs than ITC (7.07 and 0.20 µg/ml, respectively) for all isolates. In general, ABC and RVC were the most active drugs tested. VRC also showed good in vitro activity, as has been reported by other authors (21, 23). In this study, we have compared the antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates. When all the strains of the two species were considered together, we did not find any statistically significant differences associated with origins ($P < 0.05$). Our results are in agreement with those obtained by other authors (6, 12), who also demonstrated that antifungal susceptibility is not dependent on the origin of the isolates tested. Comparative studies to determine the differences between the in vitro

susceptibilities of the two species are scarce, and the results obtained are contradictory. For example, using a microdilution method, Calvo et al. (1) compared the activities of AMB, FLC, ITC, and 5FC against 89 isolates of *C. neoformans* and only 11 isolates of *C. gattii*. They obtained very similar MICs for both species. Similar results were obtained by Moraes et al. (12), who tested the same drugs by a macrodilution method, and by Chen et al. (2), who tested by a microdilution method. However, the results of these two studies disagree with those of the study of Yee-Chun et al. (22), who demonstrated that *C. gattii* is less susceptible than *C. neoformans* to 5FC and AMB. By contrast, our results indicated that *C. gattii* was as susceptible as *C. neoformans* to 5FC and AMB. However, *C. gattii* was more resistant than *C. neoformans* to the other antifungal agents tested.

New drugs such as posaconazole have been reported to possess fungicidal activity against *C. neoformans* (16). In this study, we have determined the MFCs of the nine antifungal agents but only AMB showed fungicidal activity.

In summary, we have demonstrated that there are some differences in the antifungal susceptibilities of the two species of *Cryptococcus*. However, further in vivo studies are needed in order to ascertain the predictive value of these in vitro data.

We thank Isabel Inza for help in statistical analysis. The work was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ, Rio de Janeiro, Brazil, and by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 020114).

REFERENCES

1. Calvo, B. M., A. L. Colombo, O. Fischman, A. Santiago, L. Thompson, M. Lazera, F. Telles, K. Fukushima, K. Nishimura, R. Tanaka, M. Myiajy, and L. Moretti-Branchini. 2001. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2348–2350.

2. **Chen, S., T. Sorrel, G. Nimmo, B. Speed, B. Currie, D. Ellis, D. Marriot, P. Pfeiffer, D. Parr, K. Byth, and the Australasian Cryptococcal Study Group.** 2000. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clin. Infect. Dis.* **31**:499–508.
3. **Correa, M. P., E. C. Oliveira, R. R. Duarte, P. P. Pardo, F. M. Oliveira, and L. C. Severo.** 1999. Criptococose em crianças no estado do Pará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **32**:505–508.
4. **Diaz, M. R., T. Boekhout, B. Theelen, and J. W. Fell.** 2000. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:535–545.
5. **Espinel-Ingroff, A., A. Fothergill, J. Peter, M. G. Rinaldi, and T. J. Walsh.** 2002. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3204–3208.
6. **Franzot, S. P., and J. S. Hamdan.** 1996. In vitro susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:822–824.
7. **Kwon-Chung, K. J., and J. E. Bennett.** 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* **35**:270–272.
8. **Kwon-Chung, K. J., T. Boekhout, J. W. Fell, and M. Diaz.** 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (*Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae*). *Taxon* **51**:804–806.
9. **Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck, and J. E. Bennett.** 1982. 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.* **15**:535–537.
10. **Lozano-Chiu, M., V. L. Paetznick, M. A. Ghannoum, and J. H. Rex.** 1998. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2817–2822.
11. **Maxwell, M. J., S. A. Messer, R. J. Hollis, L. Boyken, S. Tendolkar, D. J. Diekema, and M. A. Pfaller.** 2003. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from

- blood. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1087–1090.
12. **Moraes, E. M. P., N. S. Prímola, and J. S. Hamdan.** 2002. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses* **46**:164–168.
13. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
14. **Nishikawa, M., M. S. La’zera, G. G. Barbosa, L. Trilles, B. R. Balassiano, R. C. Macedo, C. C. Bezerra, M. A. Pe’rez, P. Cardarelli, and B. Wanke.** 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J. Clin. Microbiol.* **41**:73–77.
15. **Oakley, K. L., C. Moore, and D. Denning.** 1997. In vitro activity of SCH-56592 and comparison with activities of amphotericin B and itraconazole against *Aspergillus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1124–1126.
16. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, and R. N. Jones.** 2001. In vitro activities of posaconazole (Sch 56592) compared with those of itraconazole and fluconazole against 3,685 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2862–2864.
17. **Saag, M. S., R. J. Graybill, R. A. Larsen, P. G. Pappas, J. R. Perfect, W. G. Powderly, J. D. Sobel, and W. E. Dismukes.** 2000. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin. Infect. Dis.* **30**:710–718.
18. **Sorrel, T. C.** 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.* **39**: 155–168.
19. **Speed, B., and D. Dunt.** 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis.* **21**:28–34.
20. **Tawara, S., F. Ikeda, K. Maki, Y. Morishita, K. Otomo, N. Teratani, T. Goto, M. Tomishima, H. Ohki, A. Yamada, K. Kawabata, H. Takasugi, K. Sakane, H. Tanaka, F. Matsumoto, and S. Kuwahara.** 2000. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:57–62.
21. **Yamazumi, T., M. A. Pfaller, S. A. Messer, A. Houston, R. J. Hollis, and R. N. Jones.** 2000. In vitro activities of ravuconazole (BMS-207147) against 541 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2883–2886.

22. **Yee-Chun, C., C. Shan-Chwen, S. Chiang-Ching, H. Chien-Ching, L. Kwen-Tay, P. Yueh-Shya, and H. Wei-Chuan.** 2000. Clinical features and in vitro susceptibilities of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **36**:175–183.
23. **Yildiran, S. T., A. W. Fothergill, D. A. Sutton, and M. G. Rinaldi.** 2002. In vitro susceptibilities of cerebrospinal fluid of *Cryptococcus neoformans* collected during a ten-year period against fluconazole, voriconazole, and posaconazole (SCH56592). *Mycoses* **45**:378–383.
24. **Yildiran, S. T., M. A. Saracli, A. W. Fothergill, and M. G. Rinaldi.** 2000. In vitro susceptibility of environmental *Cryptococcus* variety *neoformans* isolates from Turkey to six antifungal agents, including SCH56592 and voriconazole. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:317–319.

TABLE 1. Minimum inhibitory concentrations of nine antifungal agents against 87 isolates of *Cryptococcus* spp.

Species (n° tested)	MIC parameter ^a	MIC (µg/ml)								
		ABZ	AMB	ITZ	5-FC	FCZ	MCF	KTZ	RVZ	VCZ
<i>C. gattii</i> (57)	Range	<0.03-0.5	0.25-2	0.03-0.5	0.5->64	1-64	>128	<0.03-0.5	<0.03-0.5	<0.03-1
	GM	0.06	0.59	0.28	6.16	9.54	>128	0.10	0.10	0.15
	MIC ₉₀	0.125	1	0.5	16	32	>128	0.25	0.25	0.25
<i>C. neoformans</i> (30)	Range	<0.03-0.5	0.25-2	<0.03-0.5	2-16	1-32	64->128	<0.03-0.25	<0.03-0.125	<0.03-0.25
	GM	0.02	0.51	0.11	5.12	3.89	>128	0.04	0.02	0.06
	MIC ₉₀	0.06	1	0.25	8	8	>128	0.125	0.06	0.125
Total (87)	Range	<0.03-0.5	0.25-2	<0.03-0.5	0.5->64	1-64	64->128	<0.03-0.5	<0.03-0.5	>0.03-1
	GM	0.04	0.55	0.20	5.75	7.07	>128	0.07	0.05	0.11
	MIC ₉₀	0.125	1	0.5	16	32	>128	0.25	0.25	0.25

^aGM, geometric mean MIC; MIC₉₀, MICs at which 90% of isolates were inhibited

TABLE 2. MFCs of eight antifungal agents against 87 isolates of *Cryptococcus* spp.

Species (n° tested)	MIC parameter ^a	MIC (µg/ml)							
		ABZ	AMB	ITZ	5-FC	FCZ	KTZ	RVZ	VCZ
<i>C. gattii</i> (57)	Range	<0.03-16	0.25-8	0.03-0.5	8->64	0.25->64	0.03->16	0.03->16	0.06->16
	GM	1.22	1.04	2.46	>64	46.65	1.90	2.17	2.91
	MIC ₉₀	>16	2	>16	>64	>64	>16	16	>16
<i>C. neoformans</i> (30)	Range	0.03->16	0.5-8	0.06->16	4-16	2->64	0.03->16	<0.03-0.125	<0.03-0.25
	GM	2.28	1.02	2.46	>64	18.81	1.58	2.64	3.07
	MIC ₉₀	>16	2	16	>64	>64	>16	>16	>16
Total (87)	Range	0.03->16	0.25-8	<0.03-0.5	4->64	1-64	0.03->16	<0.03-0.5	>0.03-1
	GM	>16	2	>16	>64	>64	>16	16	>16
	MIC ₉₀	>16	2	>16	>64	>64	>16	>16	>16

^aThe MFC of MFG was not determined (MIC, >128 µg/ml). GM, geometric mean; 90%, MFCs at which 90% of isolates tested were killed.

5 - ARTIGO II

In vitro Interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical Isolates of four Species of *Cryptococcus*.

Publicado na revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy em julho de 2005. Vol. 49(7), p. 2994–2996.

Ainda com o objetivo de caracterizar a suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* spp., este segundo artigo busca novas opções de tratamento para a criptococose com a avaliação *in vitro* da suscetibilidade de várias espécies de *Cryptococcus* spp. frente a micafungina associada à anfotericina B e a azóis.

In Vitro Interactions of Micafungin with Other Antifungal Drugs against Clinical Isolates of Four Species of *Cryptococcus*

Carolina Serena¹, Belkys Fernández-Torres¹, F. Javier Pastor¹, Luciana Trilles², Márcia dos Santos Lazéra², Nicole Nolard³, and Josep Guarro^{1*}

*Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain*¹; *Servicio de Micología Médica, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil*²; and *Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium*³

Received 3 February 2005/Returned for modification 3 March 2005/Accepted 11 March 2005

Abstract

The combination of micafungin (MFG) with amphotericin B (AMB), fluconazole, itraconazole, voriconazole, or ravuconazole was evaluated against 37 strains of four species of *Cryptococcus* by the checkerboard method. Antagonism was never seen. Synergy was observed for some isolates for each combination and was most frequent with MFG-AMB.

Cryptococcosis is, despite aggressive antifungal therapy, an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients, especially those with AIDS (4, 6, 12). Apart from *Cryptococcus neoformans*, other species of this genus are commonly involved in human infections, e.g., *C. gattii* and, less frequently, *C. albidus* and *C. laurentii* (13, 15, 16). The treatment of choice for cryptococcosis is amphotericin B (AMB), with or without flucytosine (5FC) and fluconazole (FLC) (24). The toxicity of AMB and 5FC and the increasing isolation of FLC-resistant strains (5, 25) underline the need for improved treatments and the use of new strategies.

Combined therapies can be useful for this purpose (17). Several studies have evaluated the interactions of AMB or 5FC with other drugs or with each other against *Cryptococcus* (1, 2, 3, 10, 20, 21, 26), but little is known about the interactions between echinocandins and AMB or azoles (10, 23). We have evaluated the activity of micafungin (MFG) in combination with four other drugs against strains of the four species of *Cryptococcus* mentioned above.

We tested a total of 37 clinical isolates (Tables 1 and 2). Antifungal agents were obtained as pure powders. AMB, voriconazole (VRC), itraconazole (ITC), and ravuconazole (RVC) were diluted in dimethyl sulfoxide. MFG and FLC were diluted in sterile distilled water. For all drugs, the MIC was defined as the lowest drug concentration that produced 100% inhibition of visible fungal growth after 72 h of incubation. Antifungal agents were placed in rows or in columns of the trays to test all possible combinations; the highest concentrations were 4 µg/ml for AMB, 8 µg/ml for ITC, VRC and RVC, and 32 µg/ml for FLC and MFG. Drug interactions were assessed by a checkerboard microdilution method (8). The MIC of each drug alone was determined according to the NCCLS (19). The fractional inhibitory concentration index (FICI) was used to classify drug interactions (14). The procedure, conservation of the strains, and quality controls have all been detailed previously (22, 28). Approximately 80% of the tests were repeated, and interactions mainly showed the same tendencies (data not shown).

Table 1 shows the in vitro interactions between MFG and AMB or FLC against clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii*. Due to the low MICs of ITC, VRC, and RVC for the strains of *C. neoformans* and *C. gattii* tested (<0.12 µg/ml in all cases), we could not evaluate the in vitro interactions of MFG with these azoles against these species. MFG-AMB showed the highest percentage of synergistic interactions (70% for *C. neoformans* and 80% for *C. gattii*). MFG-FLC showed a lower percentage of synergistic interactions (30% for *C. neoformans* and 20% for *C. gattii*).

Table 2 shows the in vitro interactions between MFG and AMB or azoles against clinical isolates of *C. albidus* and *C. laurentii*. MFG in combination with AMB showed synergy for five isolates of *C. albidus* (50%) and five of *C. laurentii* (71%). Synergistic interactions between MFG and FLC were observed for four isolates of *C. albidus* (40%) and three isolates of *C. laurentii* (15%). For the two species, MFG

combined with ITC showed similar percentages of synergistic interactions, i.e., 30 and 29%, respectively. Interactions between MFG and VRC were highly dependent on the species tested. With six isolates of *C. albidus* (60%), this combination showed synergy, whereas for all isolates of *C. laurentii* tested, the results were indifferent. A high number of synergistic interactions were observed with MFG in combination with RVC for both species tested (60% for *C. albidus* and 71% for *C. laurentii*).

Antagonism was not detected for any of the antifungal combinations assayed, although in 14% of the cases MICs were higher than the highest concentrations used to detect any interaction.

In our study, AMB generally showed low MICs against all the isolates tested. AMB alone or in combination with 5FC is commonly used in the treatment of *C. neoformans* and *C. gattii* infections (24), but its toxicity limits its usefulness. FLC is an alternative regimen for colonization and mild to moderate pulmonary disease in the immunocompetent host and constitutes a consolidation therapy for severe and progressive pulmonary and central nervous system disease (24). However, in our study we observed a wide range of FLC MICs, with a predominance of MICs of 64 $\mu\text{g/ml}$. ITC can be an alternative to FLC in *C. neoformans* infections (24). In our study this drug showed low MICs for *C. neoformans*, *C. gattii*, and *C. laurentii* strains, but MICs as high as 16 $\mu\text{g/ml}$ were obtained for 3 of the 10 isolates of *C. albidus*, suggesting a lack of activity. No clinical reports exist on the use of ITC for the treatment of *C. laurentii* and *C. albidus* infections. The high toxicity of AMB, the variable activity of FLC, and the poor experience in the management of *C. laurentii* and *C. albidus* infections have led to the testing of new therapeutic approaches. Combined treatments seem to be good candidates for this purpose. In a preliminary study (data not shown), we observed a higher percentage of synergistic interactions with MFG-azole or MFG-AMB than with AMB-azole combinations. Echinocandins are inactive against *C. neoformans* (7), and data showing their in vitro activities against other *Cryptococcus* spp. are scarce (9, 28, 29). In this study, MFG alone was also inactive against all of the 37 isolates tested. However, when MFG was combined with other antifungals, especially AMB, MFG MICs often went down by as much as 10 dilutions, and in many cases they went below peak plasma levels achieved by this drug in humans (7) and experimental infection (11). Although combinations of MFG

with azoles have also frequently resulted in synergistic interactions, MICs were generally over the therapeutic values.

MFG combined with AMB or azoles has also demonstrated synergy and efficacy in animal model infections of *Aspergillus fumigatus* (18) and *Trichosporon asahii* (27). The good results obtained in this study encourage us to perform further studies with animal models to confirm the potential of these combinations for the treatment of cryptococcosis.

We thank C. Sanmarti for technical assistance. This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain (PI 020114).

REFERENCES

1. **Barchiesi, F., D. Arzeni, A. W. Fothergill, L. F. Di Francesco, F. Caselli, M. G. Rinaldi, and G. Scalise.** 2000. In vitro activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:226–229.
2. **Barchiesi, F., D. Gallo, F. Caselli, L. F. Di Francesco, D. Arzeni, A. Giacometti, and G. Scalise.** 1999. In-vitro interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:65–70.
3. **Barchiesi, F., A. M. Schimizzi, L. K. Najvar, R. Bocanegra, F. Caselli, S. Di Cesare, D. Giannini, L. F. Di Francesco, A. Giacometti, F. Carle, G. Scalise, and J. R. Graybill.** 2001. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1355–1359.
4. **Bennett, J. E., W. E. Dismukes, R. J. Duma, G. Medoff, M. A. Sande, H. Gallis, J. Leonard, B. T. Fields, M. Bradshaw, H. Haywood, Z. A. McGee, T. R. Cate, C. G. Cobbs, J. F. Warner, and D. W. Alling.** 1979. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* **301**:126–131.
5. **Currie, B. P., M. Ghannoum, L. Bessen, and A. Casadevall.** 1995. Decreased fluconazole susceptibility of a relapse *Cryptococcus neoformans* isolate after fluconazole treatment. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **4**:318–319.

6. **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gene´, and M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, and University Rovira I Virgili, Reus, Spain.
7. **Denning, D. W.** 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**:1142–1151.
8. **Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering.** 1991. Antimicrobial combinations, p. 432–492. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
9. **Espinel-Ingroff, A.** 2003. 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.* **20**:121–136.
10. **Franzot, S. P., and A. Casadevall.** 1997. Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:331–336.
11. **Groll, A. H., D. Mickiene, V. Petraitis, R. Petraitiene, K. H. Ibrahim, S. C. Piscitelli, I. Bekersky, and T. J. Walsh.** 2001. Compartmental pharmacokinetics and tissue distribution of the antifungal echinocandin lipopeptide micafungin (FK463) in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3322–3327.
12. **Groll, A. H., and T. J. Walsh.** 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**(Suppl. 2):8–24.
13. **Johnson, L. B., S. F. Bradley, and C. A. Kauffman.** 1998. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcaemia. *Mycoses* **41**:277–280.
14. **Johnson, M. D., C. MacDougall, L. Ostrosky-Zeichner, J. R. Perfect, and J. H. Rex.** 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:693–715.
15. **Karstaedt, A. S., H. H. Crewe-Brown, and F. Dromer.** 2002. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, in AIDS patients in Soweto, South Africa. *Med. Mycol.* **40**:7–11.
16. **Kordossis, T., A. Avlami, A. Velegraki, I. Stefanou, G. Georgakopoulos, C. Papalambrou, and N. J. Legakis.** 1998. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med. Mycol.* **36**:335–339.

17. **Lewis, R. E., and D. P. Kontoyiannis.** 2001. Rationale for combination antifungal therapy. *Pharmacotherapy* **21**:149S–164S.
18. **Luque, J. C., K. V. Clemons, and D. A. Stevens.** 2003. Efficacy of micafungin alone or combination against systemic murine aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1452–1455.
19. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
20. **Nguyen, M. H., F. Barchiesi, D. A. McGough, V. L. Yu, and M. G. Rinaldi.** 1995. In vitro evaluation of combination of fluconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1691–1695.
21. **Nguyen, M. H., L. K. Najvar, C. Y. Yu, and J. R. Graybill.** 1997. Combination therapy with fluconazole and flucytosine in the murine model of cryptococcal meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1120–1123.
22. **Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol, C. Yustes, C. Serena, and J. Guarro.** 2004. In vitro interactions of approved and novel drugs against *Paecilomyces* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2727–2729.
23. **Roling, E. E., M. E. Klepser, A. Wasson, R. E. Lewis, E. J. Ernst, and M. A. Pfaller.** 2002. Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43**:13–17.
24. **Saag, M. S., R. J. Graybill, R. A. Larsen, P. G. Pappas, J. R. Perfect, W. G. Powderly, J. D. Sobel, and W. E. Dismukes.** 2000. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin. Infect. Dis.* **30**:710–718.
25. **Sar, B., D. Monchy, M. Vann, C. Keo, J. L. Sarthou, and Y. Buisson.** 2004. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:563–565.

26. **Schwarz, P., F. Dromer, O. Lortholary, and E. Dannaoui.** 2003. In vitro interaction of flucytosine with conventional and new antifungals against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3361–3364.
27. **Serena, C., F. J. Pastor, F. Gilgado, E. Mayayo, and J. Guarro.** 2005. Efficacy of micafungin in combination in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:497–502.
28. **Serena, C., F. J. Pastor, M. Ortoneda, J. Capilla, N. Nolard, and J. Guarro.** 2004. In vitro antifungal susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2724–2726.
29. **Trilles, L., B. Fernández-Torres, M. D. S. Lazera, B. Wanke, and J. Guarro.** 2004. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4815–4817.

TABLE 1. Interactions of MFG with AMB and FLC against isolates of *C. neoformans* and *C. gattii*

Species (<i>n</i>) and isolate ^a tested	MIC (µg/ml)			FICI ^b for		MIC (µg/ml)		FICI ^b for
	AMB	MFG	AMB-MFG	AMB	MFG	FLC	FLC-MFG	FLC MFG
<i>C. neoformans</i> (10)								
FMR 8393	1	64	0.25/16	0.5		16	16/64	2
FMR 8398	1	64	0.25/16	0.5		32	32/64	2
FMR 8400	0.5	64	0.12/8	0.4		16	16/64	2
FMR 8401	0.5	64	0.12/8	0.4		8	2/2	0.3
FMR 8408	0.25	64	0.12/4	0.6		2	2/64	2
FMR 8409	0.5	64	0.12/16	0.5		1	1/64	2
FMR 8411	1	64	0.25/2	0.3		32	4/0.25	0.1
FMR 8415	0.5	64	0.25/4	0.6		8	8/64	2
FMR 8416	0.5	64	0.12/16	0.5		8	8/64	2
FMR 8420	0.25	64	0.12/8	0.6		4	1/16	0.5
<i>C. gattii</i> (10)								
FMR 8402	0.5	64	0.12/16	0.5		64	64/64	2
FMR 8403	0.06	64	0.06/0.06	1		32	32/64	2
FMR 8404	0.5	64	0.12/0.25	0.2		64	64/64	2
FMR 8405	0.25	64	0.12/2	0.6		64	64/64	2
FMR 8406	0.5	64	0.12/0.5	0.2		32	32/64	2
FMR 8407	0.25	64	0.06/16	0.5		64	64/64	2
FMR 8410	0.25	64	0.06/16	0.5		32	8/16	0.5
FMR 8412	0.25	64	0.06/16	0.5		8	2/16	0.5
FMR 8413	0.25	64	0.06/16	0.5		32	32/64	2
FMR 8414	0.5	64	0.12/0.25	0.2		32	32/64	2

^a FMR, Faculty of Medicine, University of Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain.

^b FICI scores: ≤0.5, synergistic; >0.5 and ≤4, indifferent; >4, antagonistic (14).

TABLE 2. Interactions of MFG with AMB and various azoles against isolates of *C. albidus* and *C. laurentii*

Species (n) and isolate ^a tested	MIC (µg/ml)			FICI ^b for AMB MFG	MIC (µg/ml)			FICI for FLC MFG	MIC (µg/ml)		FICI for ITC-MFG	MIC (µg/ml)		FICI for VRC-MFG	MIC (µg/ml)		FICI for RVC-MFG
	AMB	MFG	FLC		FLC	FLC-MFG	ITC		ITC-MFG	VRC		VRC-MFG	RVC		RVC-MFG		
<i>C. albidus</i> (10)																	
IHEM 4786	0.5	64	0.25/8	0.6	64	64/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2	16	8/32	1	
IHEM 2740	0.25	64	0.06/16	0.5	64	64/64	2	1	1/64	2	2	2/64	2	1	0.25/16	0.5	
IHEM 3267	0.5	64	0.12/16	0.5	64	64/64	2	0.25	0.25/64	2	8	2/8	0.4	8	1/8	0.2	
IHEM 5516	0.5	64	0.25/8	0.6	64	16/16	0.5	0.5	0.12/16	0.5	0.5	0.12/0.25	0.2	1	0.25/16	0.5	
IHEM 6283	0.25	64	0.12/8	0.6	32	16/0.06	0.6	4	1/8	0.3	16	4/0.06	0.2	16	8/8	0.6	
IHEM 6286	0.5	64	0.25/4	0.6	64	64/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2	16	16/24	2	
IHEM 6699	0.25	64	0.06/0.25	0.4	64	16/4	0.3	0.5	0.25/16	2	2	0.5/16	0.5	0.25	0.06/0.06	0.2	
IHEM 6723	1	64	0.25/16	0.5	64	64/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2	16	16/64	2	
IHEM 6895	0.5	64	0.12/16	0.5	64	16/0.5	0.2	1	0.25/16	0.5	1	0.25/16	0.5	2	0.5/16	0.5	
IHEM 10432	0.25	64	0.12/1	0.6	16	4/0.25	0.2	0.25	0.12/2	0.6	0.25	0.06/16	0.5	0.25	0.06/16	0.5	
<i>C. laurentii</i> (7)																	
IHEM 8060	0.5	64	0.12/16	0.5	16	16/64	2	1	0.25/16	0.5	0.25	0.25/64	2	2	0.06/16	0.5	
IHEM 8061	0.5	64	0.12/8	0.3	4	4/64	2	4	4/64	2	2	2/64	2	2	1/16	0.5	
IHEM 8062	0.5	64	0.12/16	0.5	32	16/0.06	0.6	1	0.25/16	0.5	0.5	2/64	2	2	0.12/8	0.6	
IHEM 8063	0.5	64	0.12/16	0.5	2	1/0.06	0.6	0.25	0.25/64	2	2	1/64	2	2	0.06/16	0.5	
IHEM 8064	0.25	64	0.12/64	0.7	64	64/64	2	0.12	0.12/64	2	2	0.12/64	2	2	0.5/64	2	
FMR 8123	0.25	64	0.06/0.06	0.2	32	32/64	2	0.5	0.5/64	2	2	0.25/64	2	2	0.12/64	2	
FMR 8515	0.5	64	0.12/16	0.5	64	16/0.06	0.2	0.5	0.12/16	0.5	0.5	0.25/16	0.7	0.7	0.5/64	2	

^a FMR, Faculty of Medicine, University of Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain; IHEM, Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute, Brussels, Belgium.

^b FICI scores: ≤0.5, synergistic; >0.5 and ≤4, indifferent; >4, antagonistic (14).

6 - ARTIGO III

Rolling circle amplification as a rapid and sensitive method for species identification within the *Cryptococcus* species complex.

O artigo foi enviado para a revista “Eletrophoresis” em dezembro de 2007.

Este artigo descreve uma nova técnica molecular, “rolling circle amplification” (RCA), sendo aplicada pela primeira vez no complexo de espécies *C. neoformans* para ser utilizada na identificação *C. neoformans* e *C. gattii*, incluindo a identificação dos tipos moleculares e de híbridos, de uma forma rápida e com alta sensibilidade.

Rolling circle amplification as a rapid and sensitive method for species identification within the *Cryptococcus* species complex

Sirada Kaocharoen^{1,2}, Bin Wang³, Kin Ming Tsui¹, Luciana Trilles⁴, Fanrong Kong⁵, and Wieland Meyer^{1,6}

¹Molecular Mycology Research Laboratory, Centre for Infectious Diseases and Microbiology, Westmead Millennium Institute, Westmead Hospital, Westmead, Australia; ²Inter-Department of Medical Microbiology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; ³Retroviral Genetics Laboratory, Centre for Virus Research, Westmead Millennium Institute, Westmead Hospital, The University of Sydney, Australia; ⁴Laboratório de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; ⁵Centre for Infectious Diseases and Microbiology – Public Health, Institute of Clinical Pathology and Medical Research, Westmead Hospital, Westmead, Australia; ⁶Faculty of Medicine, The University of Sydney, Western Clinical School at Westmead Hospital, Sydney, Australia

***Corresponding author:** A/Prof. Wieland Meyer, Molecular Mycology Research Laboratory, CIDM, ICPMR, Westmead Hospital, Level 3, Room 3114A, Darcy Road, Westmead, NSW 2145, Australia, Phone: +61-298456895, Fax: +61-2-9905431, E-mail: w.meyer@usyd.edu.au

Abbreviations: ITS = internal transcribed spacer; RCA = rolling circle amplification; AFLP = amplified fragment length polymorphism; CGB = Canavanine-glycine bromthymol blue.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, species identification, rolling circle amplification, ITS

ABSTRACT

The *Cryptococcus* species complex contains two closely related basidiomycetous yeast species: *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*, which cause cryptococcosis in humans and other animals. The currently recognized species and varieties are characterized, by different clinical, epidemiological, biochemical and molecular features. The currently used identification methods are either time consuming or not anymore commercially available. However, a rapid, sensitive and robust assay for the detection of these fungal pathogens is vital for early diagnosis and appropriate treatment decisions. To overcome those limitations four padlock probes targeting species-specific single nucleotide polymorphism at the internal transcribed spacers (ITS) of the rRNA gene locus were developed and applied during isothermal rolling circle amplification (RCA). The probes were tested against 99 samples, including 94 clinical cryptococcal cultures, three closely related *Cryptococcus* species, and two clinical specimens. The use of the padlock probes and the combination of probe signal amplification by RCA provided a quick and sensitive assay for the accurate identification of *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* and *C. gattii*. RCA was also useful to detect hybrids, when they were heterozygous at the ITS region of the rRNA locus. The RCA results were in agreement with the previous genotyping data based on PCR fingerprinting, AFLP and ITS sequencing.

INTRODUCTION

The *Cryptococcus* species complex contains basidiomycetous encapsulated yeasts, which are currently classified into two species with five serotypes, *C. neoformans* (serotype A, D and

AD) and *C. gattii* (serotype B and C) [1]. Both species are the causative agent of life-threatening infections in humans and other animals [2].

The first species in this species complex, *C. neoformans*, is an opportunistic human pathogen, causing infections mainly in immunocompromised patients, and occurs globally [3]. This species contains two varieties, which are separated based on their serological and molecular differences. *C. neoformans* var. *grubii*, containing isolates of serotype A, being the most prevalent strains globally [4], and *C. neoformans* var. *neoformans*, containing isolates of serotype D, being more geographically restricted to Europe and Latin America [3]. In addition to the two varieties this species also contains hybrid isolates between the two varieties, those showing an AD hybrid serotype [5].

The second species in this species complex, *C. gattii*, was recently raised to species level based on biochemical, clinical, ecological and molecular features [1], it contains isolates of the serotypes B and C [6]. This species is a primary pathogen causing infections mainly in immunocompetent patients and was thought to be geographically restricted to tropical and subtropical climate zones [2, 7]. However, since 1999 isolates of a specific molecular type (VGII) of this species are the cause of an ongoing outbreak of cryptococcosis on Vancouver Island BC, Canada, indicating a strong shift in its ecological niche [8, 9]. In addition infections caused by *C. gattii* tend to be more severe than the ones caused by *C. neoformans* resulting in pulmonary mass lesions after prolonged asymptomatic infections, which then need to be treated often much longer [10]. It is now clear that both species are substantially different in their clinical manifestations, treatment and disease outcome, which makes it necessary to develop rapid, sensitive and robust assays for the detection of these fungal pathogens to obtain an early diagnosis and make appropriate treatment decisions.

Based on molecular features the strains of the *Cryptococcus* species complex have been divided by PCR-fingerprinting [11], amplified fragment length polymorphism (AFLP) [12], *URA5*- [11] and *PLB1*-RFLP [13] analysis into eight major molecular types: isolates of *C. neoformans* var. *grubii* serotype A correspond to VNI/AFLP1 and VNII/AFLP1A; isolates of *C. neoformans* var. *neoformans*, serotype D correspond to VNIV; the AD hybrid isolates correspond to VNIII/ALFP3; and all isolates of *C. gattii* independent of their serotype B or C correspond to VGI/AFLP4, VGII/AFLP6, VGIII/AFLP5 and VGIV/AFLP7. Recently there are a number of reports on additional hybrids between the two species namely the serotypes D and B. The Dutch BD hybrids are characterised by the AFLP8 pattern [14]. Work currently underway showed that South American BA hybrids show mixed RFLP patterns, which reflect the VNI and the respective VG type involved in the hybrid [Meyer & Trilles, personal communication].

Traditionally, the identification of these fungi has been based largely on culture-based growth characteristics, subsequently confirmed by biochemical and serological assays [2]. These analyses can become cost-, labour- and time-expensive for accurate diagnosis. In addition the Crypto check kit (Iatron, Tokyo, Japan) for serotyping is no longer commercially available, making it necessary to develop alternative methods to identify the species and varieties within the *Cryptococcus* species complex. While the most sensitive tests available for the molecular detection and separation of *Cryptococcus* species complex involve the use of PCR fingerprinting [11, 15, 16], AFLP [12] and restriction fragment length polymorphism (RFLP) of *URA5*- and *PLB1*- RFLP analysis [11, 13], they are time consuming and sensitive to contamination, which can result in non-specific amplification products. Therefore alternative methods are needed to provide rapid, and reliable detection and confirmation.

Molecular padlock probe technology is a combination of pathogen-specific molecular recognition and universal amplification, which offers an alternative platform that can be handled by individuals without specialized training to detect pathogens quickly and accurately. Padlock probes are long oligonucleotides of ~100 bases, and comprise two sequences complementary to the 5' and 3' terminal of the target sequence joined by genetic linker region. When they hybridize, head to tail, to the target, the 5' and 3' terminals of the probe are juxtaposed, forming a closed, circular molecule following incubation with a DNA ligase [17]. The ability of padlock probes to accurately identify single nucleotide polymorphism (SNP)s has been demonstrated, and the intensity of the signal generated by the circularized probe can be increased, exponentially, by rolling circle amplification (RCA) (Figure 1) [18]. This technology has been used for the detection of human pathogenic viruses [19] and bacteria [20]. In this study, we investigate the use of padlock probes used in combination with RCA for high throughput rapid identification and differentiation of isolates of the *Cryptococcus* species complex.

MATERIALS AND METHODS

Cultures

A total of 99 isolates and specimens, including 94 cryptococcal cultures, three closely related species: *C. albidus*, *C. curvatus* and *C. luteolus*, and two routine clinical specimens were investigated (Table 1). These cultures are maintained at the Australian Medical Fungus Collection at Westmead Hospital, Sydney, Australia. All strains studied have been previously identified by conventional biochemical and molecular methods.

Padlock probe design

We selected internal transcribed spacers regions of the ribosomal RNA sequences [16] as the target for the specific probe design. This gene has been used extensively for the phylogeny and diagnostic identification of medical fungi, and also a large number of sequences are available for comparison. Relevant sequences [16] were downloaded from GenBank and aligned using Clustal X [21]. Four padlock probes, recognizing a specific SNP at position 110 and 223 of ITS (Figure 2), were designed as previously described [22]. The padlock probe RCA1-ITS targets a “T” at position 110, RCA2-ITS targets an “A” at position 110, RCA3-ITS targets an “A” at position 223 and finally RCA4-ITS targets a “G” at position 223 (Figure 2 and Table 2). To ensure the efficiency of padlock probe binding, the padlock probes were designed with minimum secondary structure as well as 5’ end probe binding arm T_m close to or above ligation temperature (60°C in the study, see below). To increase 3’ end binding specificity, 3’ end bind arm was designed with T_m 10°C-15°C below ligation temperature. The genetic linker region was also carefully designed to minimize any similarity to any known species after BlastN search against GenBank. In addition, the primers which were used to amplify the specific padlock probe signal during RCA, RCA-ITS-Crypto-F and RCA-ITS-Crypto-R (Table 2), were designed specifically to bind to the linker regions of the above designed padlock probes with a T_m of about 55°C.

DNA extraction and ITS PCR amplification

Genomic DNA was extracted as described previously [11]. The ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified in a 50 μ l reaction volume containing 30 ng of DNA, 1x PCR buffer (Applied Biosystems, USA), 0.2 mM of each dATP, dCTP, dGTP, and dTTP and 25 ng of each of the two primers SR6R (5’ AAGTAAGAAGTCGTAACAAGG3’) and LR1 (5’ GGTGGTTTCTTTCCT 3’) (23) and 2.5 U Taq DNA polymerase (Applied Biosystems,

USA) as described previously [16]. The amplicons were then purified with the PCR purification kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturers instructions.

Padlock probe ligation

The ligation of the padlock probe to the amplified PCR products was performed in a 10 μ l reaction mixture, containing 0.5-2pmol of PCR product, 2 U of pfu DNA ligase (Stratagene, Integrated Sciences) and 0.2 μ M of the padlock probe in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Igepal, 0.01 mM rATP, 1 mM DTT. The ligation reaction was conducted with one cycle of 3 min denaturation at 94°C followed by 5 min ligation at 65°C for probes RCA3-ITS and RCA4-ITS, and with 3 cycles of the same conditions for probes RCA1-ITS and RCA2-ITS.

Exonucleolysis

Exonucleolysis is necessary to remove non-circularised padlock probe and excess PCR product template and to reduce subsequent ligation-independent amplification. It was performed in a 20 μ l volume by adding 2 μ l of 1 \times digestion buffer and 10 U each of exonuclease I and III (New England Biolabs) to the ligation mixture. The mixtures were then incubated at 37°C for 30 min, followed by 94°C for 1 min to inactivate the exonuclease.

Hyperbranched rolling circle amplification (HRCA) reaction.

RCA reactions were performed in a 50 μ l volume by adding 30 μ l reaction mixture containing 8 U of Bst DNA polymerase (New England Biolabs), 400 μ M deoxynucleoside triphosphate mix, 10 pmol of each RCA-ITS-Crypto-F and RCA-ITS-Crypto-R primer (Table 2), 5% of DMSO (v/v) and 1X Sybr Green I (Sigma) to the post-digestion mixture. Circularized probe

signals were amplified by incubation at 65°C for 30 min and the accumulation of dsDNA products were monitored in a Corbett RotorGene 3000 real-time PCR machine (Figure 3). The end products can also be loaded on a 1.5% agarose gel and visualized under UV light. The positive signals were visualised as a ladder of bands starting at one unit circle length and extending in discrete increments to several thousands of nucleotides (Figure 4).

RESULTS AND DISCUSSION

Species detection

RCA amplification in combination with real-time-PCR was applied to differentiate the species and varieties of the *Cryptococcus* species complex from pure culture and clinical specimens. A signal generated from the respective probe demonstrated a positive result, while no signal indicated negative results (Table 1, Figure 3). All *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strains studied generated positive signals after hybridization with the probes RCA1-ITS and RCA3-ITS, and all the *C. neoformans* var. *neoformans* strains were positive with the probes RCA2-ITS and RCA4-ITS (Table 1). In contrast all the *C. gattii* strains gave positive signals with the probes RCA1-ITS and RCA4-ITS (Figure 3A). The combination of the four specific probes was able to accurately differentiate *C. neoformans* var. *grubii* and *C. neoformans* var. *neoformans* from *C. gattii* and did not generate any false positives (Table 1). All tested *C. neoformans* var. *grubii* (molecular type VNI and VNII), *C. neoformans* var. *neoformans* (VNIV) showed positive results when tested with the molecular type specific probes (Table 1). These results have been consistent with conventional typing methods such as PCR fingerprinting, *PLB1*- and *URA5*-RFLP analysis [11, 12, 13]. The combination of probes also confirmed the identity of all *C. gattii* (VGI-VGIV) strains with the exception of two strains: WM 1802 and WM 1804, which produced a weak positive result with the probe RCA1-ITS.

We therefore determined the ITS sequences of both strains, which revealed that they had a mismatch at the position 106 (where a substitution from A to C occurred, data not shown), which lead to a destabilization of the hybridization between the probe RCA1-ITS and the target sequence.

To test for species-specificity of the herein designed padlock probes we tested three closely related medical relevant species: *C. albidus*, *C. curvatus* and *C. luteolus*. All three species showed a positive result with the probe RCA3-ITS. Sequencing of the ITS region of those three species showed that they share the same SNP with *C. neoformans* var. *grubii* at position 223. However, the combination of the results of all four probes was able to accurately differentiate them from members of the *Cryptococcus* species complex. The padlock probes proved to be specific to the targeted species.

The two clinical specimens tested, containing genetic materials from human tissues, were negative to all four probes, illustrating the insensitivity of the used probes to non-target sequences. These results encourage a large scale test of the designed padlock probes in a clinical diagnostic setting.

Recognition of hybrids

Rolling circle amplification in combination with the designed padlock probes was also used to genotype ten serotype AD hybrid isolates. The obtained results were not fully congruent to that obtained by PCR fingerprinting or conventional serotyping using the Iatron Crypto check Kit (Japan). Two of the suggested AD hybrid strains were identified as *C. neoformans* var. *grubii*, showing positive results with the probes RCA1-ITS and RCA3-ITS, five were identified as *C. neoformans* var. *neoformans*, showing positive results with the probes RCA2-ITS and RCA4-ITS (Table 1). The remaining three AD hybrids produced positive signals to

all four probes, suggesting the presence of alleles from both serotypes A and D in the ribosomal gene locus. Previous research demonstrated that AD hybrids could be either diploide or aneuploids and they may not be heterozygous in all gene loci [24]. The loss of a specific gene locus could be accounted for by the fact that chromosome loss or gene reversion might have occurred as a result of genome instabilities, which in turn could account for the three different results obtained for the AD hybrid strains.

Finally RCA in combination with the herein designed padlock probes was used to genotype nine South American strains, in which contradictory results between serotyping and PCR fingerprinting/RFLP had previously been obtained (Table 3). The RCA data were consistent with the PCR fingerprinting/RFLP results for seven strains (WM 05.459, WM 05.406, WM 05.405, WM 05.549, WM 05.449, WM 05551), but provided intriguing signals for the other two strains. Strain WM 05.532 was identified as molecular type VNI and by *URA5*-RFLP as molecular type VNII, both representing *C. neoformans* var. *grubii*, but had sometimes a negative and other times a positive growth in CGB agar, indicating either being *C. neoformans* or *C. gattii*, and had serotype B, *C. gattii*. RCA indicated it could be a mix between *C. neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*, a potential AB hybrid, because it produced positive signals with three out of the four probes, with the exception of probe RCA2-ITS (Figure 3E). Strain WM 05.458 was identified by PCR fingerprinting as *C. neoformans* var. *grubii* (molecular type VNI) but serotyping and positive growth on CGB agar identified it as the serotype B, *C. gattii*. RCA suggested the strain is a mixture of both, with a weak positive signal for probe RCA4-ITS (Figure 3F), a potential AB hybrid. We have repeated the investigation and recorded the same result. These inconsistencies may be a result of aneuploidy in hybrid strains [12, 14]. Also *Cryptococcus* strains can undergo phenotypic as well as genotypic changes during prolonged propagation and improper storage.

Advantages of RCA

Diagnostic assays require speed, specificity and reproducibility all those criteria are major characteristics of padlock probes and RCA. The proposed diagnostic protocol requires only a simple PCR reaction, a couple of simple additions of buffers, primers and enzymes followed by a warming for 60 mins at 65°C, which is then followed by real-time-PCR assay.

Subsequently the hand-on time of the whole experiment is less than 5 hrs, which is significantly shorter than the time required for PCR fingerprinting, RFLP analysis. In addition it is a clear cut identification based on a simple positive or negative result obtained during RCA, eliminating subjective criteria as needed during the analysis of such complex banding patterns as being obtained by PCR fingerprinting or the possible switching results obtained in some case by serotyping. A further advantage of the herein developed RCA padlock probe identification method is that it needs only minimal amounts of starting genomic DNA, which lends the technique to be eventually used directly on yeast colonies obtained on a primary isolation plate, avoiding the growth of pure yeasts cultures before any molecular test could be carried out. Finally the test is highly specific for the members of the *Cryptococcus* species complex, since it targets single nucleotide polymorphisms (SNPs) specific for either *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* and *C. gattii*, which are then detected by RCA using specific primers targeting the loop of the *Cryptococcus* species complex specific padlock probes. For laboratories, which do not have access to real-time-PCR, the positive results could simply be visualized by normal agarose gel electrophoresis (Figure 4). Positive results are indicated by the presence of multiple bands, which are the result of hyper-branched amplification, while a negative result is caused by a mismatch between the padlock probe and the target DNA prevents the hyper-branched rolling circle amplification, which

results in the lack of band on the gel. The current RCA assay lends its self to be optimized for a multiplex strategy, which will further speed up the time for identification and differentiation.

CONCLUDING REMARKS

We have developed species- and variety-specific padlock probes, which in combination with rolling circle PCR are able to differentiate between the members of the *Cryptococcus* species complex and can be used to detect potential hybrid strains and a possible mixed infection. Further larger scale studies to determine the sensitivity and clinical utility of this method are now warranted and will be necessary before the technique can be applied in wider clinical settings.

ACKNOWLEDGMENTS

Sirada Kaocharoen, Kin Ming Tsui, and Bin Wang had similar contribution to the research, and they would be considered as co-first authors. We would like to thank Maryann Pincevic for help in sequencing. Nitin Saksena is thanked for provide laboratory facilities. The work was supported by an NH&MRC grant # 352303 to WM.

REFERENCES

1. Kwon–Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. houdurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae). *Taxon* 2002; 51: 804-806
2. Casadevall, A., and Perfect, J.R. (1998) *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, D.C.

3. Kwon-Chung KJ (1975): A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 67: 1197-1200.
4. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 137: 838–840
5. Lengeler, K.B., Cox, G.M., and Heitman, J. (2001) Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect. Immun.*, 69, 115-122.
6. Kwon-Chung KJ (1976): A new species of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* 68: 942-946.
7. Mitchell DH, Sorrell TC et al. (1995): Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin. Infect. Dis.* 20: 611-616.
8. Kidd S, Hagen F, Tschärke R, Huynh M, Bartlett K, Fyfe M, MacDougall L, Boekhout T, Kwon-Chung JK & Meyer W (2004): A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the Cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada), *PNAS* 107(49): 17258-17263.
9. MacDougall L, Kidd SE et al. (2007): Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada and Detection in the Pacific Northwest, USA. *EID* 13(1): 42-50.
10. Sorrell TC (2001): *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 39:155-168.
11. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group (2003): Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates, *Emerging Infect. Dis.*: 9(2):189-195.

12. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln EA, Dromer F & Meyer W (2000): Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 147:891-907.
13. Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC & Meyer W (2003): PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B gene (*PLB1*) for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *App. Environ. Microbiol.* 69 (4): 2080-2086.
14. Bovers, M., Hagen, F., Kuramae, E.E., Diaz, M.R., Spanjaard, L., Dromer, F., Hoogveld, H.L., and Boekhout, T. (2006) Unique hybrids between fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.*, 6, 599-607.
15. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, et al. 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* 1999; 20: 1790-1799.
16. 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.
17. Nilson, M., Malmgren, H., Samiotaki, M., Kwiatkowski, M., Chowdhary, B.P., and Landegren, U. (1994) Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localised DNA detection. *Science*, 365, 2085-2088.
18. Lizardi, P.M., Huang, X.H., Zhu, Z.G., Bray-Ward, P., Thomas, D.C. and Ward, D.C. (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling circle amplification. *Nat. Genet.*, 19, 225-232.

19. Wang,B., Potter,s.J., Lin,Y., Cunningham,A.L., Dwyer,D.E., Su,Y., Ma,X., Hou,Y., and Sakena,N.K. (2005) Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. *J. Clin. Microbial.*, 43,2339-2444.
20. Tong,Z., Kong,F., Wang,B., Zeng,X., Gilbert,G. (2007) A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III, of human origin, using rolling circle amplification. *J. Microbiol. Methods.*, 70, 39-44.
21. Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F., and Higgins,D.G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876-4882.
22. Nilsson, M. 2006. Lock and roll: single-molecule genotyping in situ using padlock probes and rolling-circle amplification. *Histochem.Cell Biol.* 126:159-164.
23. Vilgalys,R., Hesters,M., Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacterial.* 1990, 172, 4223-4246.
24. Lengeler, K., 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* 2001, 69, 115-122.

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of the different steps of RCA method used. **1. Ligation step;** Padlock probes containing the complementary sequences at the 5' and 3' end hybridized to the target template. In the case of a perfect match, the probe will be circularised by DNA ligase (**A**); while in the case of miss-match, no ligation should occur (**B**). **2. Exonuclease digestion step:** Non-hybridised template will be removed by the exonuclease. **3. Rolling circle amplification step:** Tandem repeat sequences were generated by the rolling circle amplification. **4. Detection step:** The amplification was monitored in real-time using SYBR green or agarose gel electrophoresis.

Figure 2. ITS sequence alignment of the 8 major molecular types of the *Cryptococcus* species complex to illustrating the polymorphism at the two positions 110 and 223, which were used for the padlock probe design.

Figure 3. Amplification curves for various strains in the investigation. Positive results were indicated as the florescent signals increased exponentially. **A.** *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A, molecular types VNI and VNII), e.g. strain WM 1462 ; **B.** AD hybrid (molecular type VNIII), e.g. strain WM 05.549; **C.** *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D, molecular type VNIV), e.g. strain WM 05.469; **D.** *C. gattii*, (serotypes B and C, molecular types VGI, VGII, VGIII and VGIV), e.g. strain WM 727; and **E.** potential AB hybrids with a strong signal for probe RCA4-ITS, e.g. strain WM 05.532 and **F.** potential AB hybrid with a weak signal for probe RCA4-ITS, e.g. strain WM 05.458.

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of strain WM 1462 (*C. neoformans* var. *grubii*, VNI) as an alternative visualization method to real-time-PCR.

Table 1. The strains and specimens investigated in this study and the results obtained by RCA.

WM number	Other no.	Molecular type	Serotype	RCA1-ITS	RCA2-ITS	RCA3-ITS	RCA4-ITS
<i>Cryptococcus neoformans var grubii</i>							
WM 419	ATCC90112	VNI	A	P	N	P	N
WM 2573	M27049	VNI	A	P	N	P	N
WM 721		VNI	A	P	N	P	N
WM 148	VNI standard strain	VNI	A	P	N	P	N
WM 1416	RV59369	VNI	A	P	N	P	N
WM 1421	NIH193	VNI	A	P	N	P	N
WM 1641	LA26	VNI	A	P	N	P	N
WM 1897	LA182	VNI	A	P	N	P	N
WM 1742	LA264	VNI	A	P	N	P	N
WM 1948	LA201	VNI	A	P	N	P	N
WM 05.413	LMM254	VNI	A	P	N	P	N
WM 05.557	LMM1072	VNI	A	P	N	P	N
WM 05.459	LMM558	VNI	B	P	N	P	N
WM 05.406	LMM192	VNI	B	P	N	P	N
WM 2529	JG-02	VNII	A	P	N	P	N
WM 2577	M27053	VNII	A	P	N	P	N
WM 1352	PR-101	VNII	A	P	N	P	N
WM 1462	UON 11536	VNII	A	P	N	P	N
WM 626	VNII standard strain	VNII	A	P	N	P	N
WM 1408	Hamden C3-1	VNII	A	P	N	P	N
WM 1412	RV 58146	VNII	A	P	N	P	N
WM 553		VNII	A	P	N	P	N
WM 1816	LA 404	VNII	A	P	N	P	N
WM 1986	LA511	VNII	A	P	N	P	N
WM 05.405	LMM184	VNII	B	P	N	P	N
WM 05.549	LMM837	VNII (VNIII)	D	P	P	P	P
WM 628	VNIII standard strain	VNIII	AD	N	P	N	P
WM 1529	RKI-M364/98	VNIII	AD	P	P	P	P
WM 1524	RKI-M1644/90	VNIII	AD	N	P	N	P
WM 1355	TBS 54	VNIII	AD	P	P	P	P
WM 1874	LA192	VNIII	AD	P	N	P	N
WM 1738	LA260	VNIII	AD	N	P	N	P
WM 02.150		VNIII	AD	P	P	P	P
WM 02.155		VNIII	AD	P	N	P	N
WM 1523	RKI-A208	VNIII	AD	N	P	N	P
WM 01.123	CBS132	VNIII	AD	N	P	N	P
WM 629	VNIV standard strain	VNIV	D	N	P	N	P
WM 04.174	RKI-M186/99	VNIV	D	N	P	N	P
WM 04.172	RKI-M318/90	VNIV	D	N	P	N	P
WM 2359	ATCC52817	VNIV	D	N	P	N	P
WM 04.171	CBS7816	VNIV	D	N	P	N	P
WM 04.168	LA268	VNIV	D	N	P	N	P
WM 01.126		VNIV	D	N	P	N	P
WM 01.127		VNIV	D	N	P	N	P
WM 02.142		VNIV	D	N	P	N	P
WM 1740	LA262	VNIV	D	N	P	N	P

WM 05.469	LMM13A1	VNIV	D	N	P	N	P
Potential <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> hybrids							
WM 05.532	LMM868	VNI (VNII)	B	P	N	P	P
WM 05.458	LMM505	VNI	B	P	N	P	P
<i>Cryptococcus gattii</i>							
WM 1616	LA1	VGI	B	P	N	N	P
WM 1251		VGI	B	P	N	N	P
WM 179		VGI	B	P	N	N	P
WM 1243		VGI	B	P	N	N	P
WM 2634	MC-S-022	VGI	B	P	N	N	P
WM 727		VGI	B	P	N	N	P
WM 2540	TP1414	VGI	B	P	N	N	P
WM 1899	LA175	VGI	B	P	N	N	P
WM 2039	LA564	VGI	B	P	N	N	P
WM 02.204		VGI	B	P	N	N	P
WM 05.449	LMM378	VGI	AD	P	N	N	P
WM 05.412	LMM253	VGI	A	P	N	N	P
WM 178		VGII	B	P	N	N	P
WM 06.634	DMST 20765	VGII	B	P	N	N	P
WM 02.39	R272	VGII	B	P	N	N	P
WM 05.75	AV54	VGII	B	P	N	N	P
WM 06.8	LA43	VGII	B	P	N	N	P
WM 04.71	VPB 571-058	VGII	B	P	N	N	P
WM 05.385	HOO58I1677	VGII	B	P	N	N	P
WM 06.13	CBS7750	VGII	B	P	N	N	P
WM 1761	LA285	VGII		P	N	N	P
WM 638		VGII		P	N	N	P
WM 05.525	LMM631	VGII	B	P	N	N	P
WM 05.551	LMM994	VGII	BD	P	N	N	P
WM 175		VGIII	B	P	N	N	P
WM 2423	CN043	VGIII		P	N	N	P
WM 728		VGIII	B	P	N	N	P
WM 161		VGIII	B	P	N	N	P
WM 726		VGIII	B	P	N	N	P
WM 1665	UCLA 380C	VGIII	C	P	N	N	P
WM 1699	LA290	VGIII		P	N	N	P
WM 1846	LA 382	VGIII	C	P	N	N	P
WM 2088	LA622	VGIII	B	P	N	N	P
WM 2158	LA644	VGIII	C	P	N	N	P
WM 779		VGIV	C	P	N	N	P
WM 2364	B-5748	VGIV	B	P	N	N	P
WM 2363	B-5742	VGIV	B	P	N	N	P
WM 04.20	M27055	VGIV	C	P	N	N	P
WM 2579	M27056	VGIV		P	N	N	P
WM 780	V00709	VGIV	C	P	N	N	P
WM 1220	CBS7748	VGIV	B	P	N	N	P
WM 1802	LA390	VGIV		Weak P	N	N	P
WM 1804	LA392	VGIV		Weak P	N	N	P
WM 2041	LA568	VGIV	B	P	N	N	P
<i>C. luteolus</i>							

WM 775	CBS943	N	N	P	N
<i>C. curvatus</i>					
WM 56	CBS570	N	N	P	N
<i>C. albidus</i>					
WM 773		N	N	P	N
Specimens					
Throat swap		N	N	N	N
Sputum		N	N	N	N

Table 2. Padlock probes and padlock probe specific 1 primers used. The 5' and 3' ends of the primers, that are complementary to the target sequences, are underlined. The regions where the two padlock probe specific primers (RAC-ITS-Crypto-F and RCAITS-Crypto-R) bind for real-time amplification are in bold.

Probe	Sequence	Specific targeted molecular type
RCA1-ITS	5' <u>GAT TAC ATT CAT TAC ATT TAG</u> <u>AAG TTT GTG ATC</u> ATG CTT CTT CGG TGC CCA TTA CGA GGT GCG GAT AGC TAC CGC GCA GAC ACG ATA GTC TAA AAG <u>TTT TAT TAT</u> <u>TGT TAT AAT AA</u> 3'	VNI, VNII, VGI-VGIV
RCA2-ITS	5' <u>GAT TAC ATT CAT TAC ATT TAG</u> <u>AAG TTT GTG ATC</u> ATG CTT CTT CGG TGC CCA TCC TAG ATC AGA CGT TCC TGT CCG CGC AGA CAC GAT AGT CTA AAA GTT <u>TTA TTA</u> <u>TTG TTA TAA TAT</u> 3'	VNIII-VNIV
RCA3-ITS	5' <u>TCG ATG ATT CAC TGA ATT CTG</u> <u>CGA TCA TGC TTC TTC</u> GGT GCC CAT TCG TGG CTA GTC GAA TCT TAG CGC GCA GAC ACG ATA <u>GTC</u> <u>TAA GTT GCG TTC AAA GAT</u> 3'	VNI, VNII
RCA4-ITS	5' <u>TCG ATG ATT CAC TGA ATT CTG</u> <u>CGA TCA TGC TTC TTC</u> GGT GCC CAT GCT AAC CTG GTA CCG TCA TTC GCG CAG ACA CGA TAG <u>TCT</u> <u>AAG TTG CGT TCA AAG AC</u> 3'	VNIII, VNIV, VGI-VGIV
Primer-1	5' ATGGGCACCGAAGAAGCA 3'	
Primer-2	5' CGCGCAGACACGATA 3'	

Figure 1.

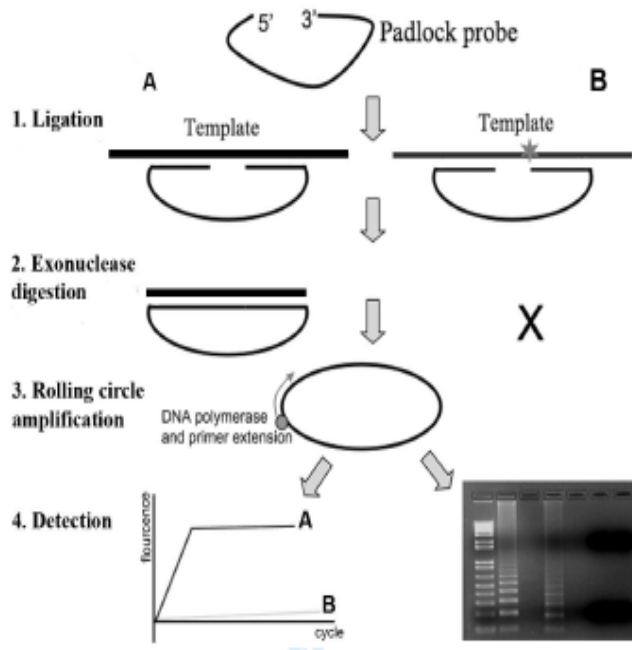
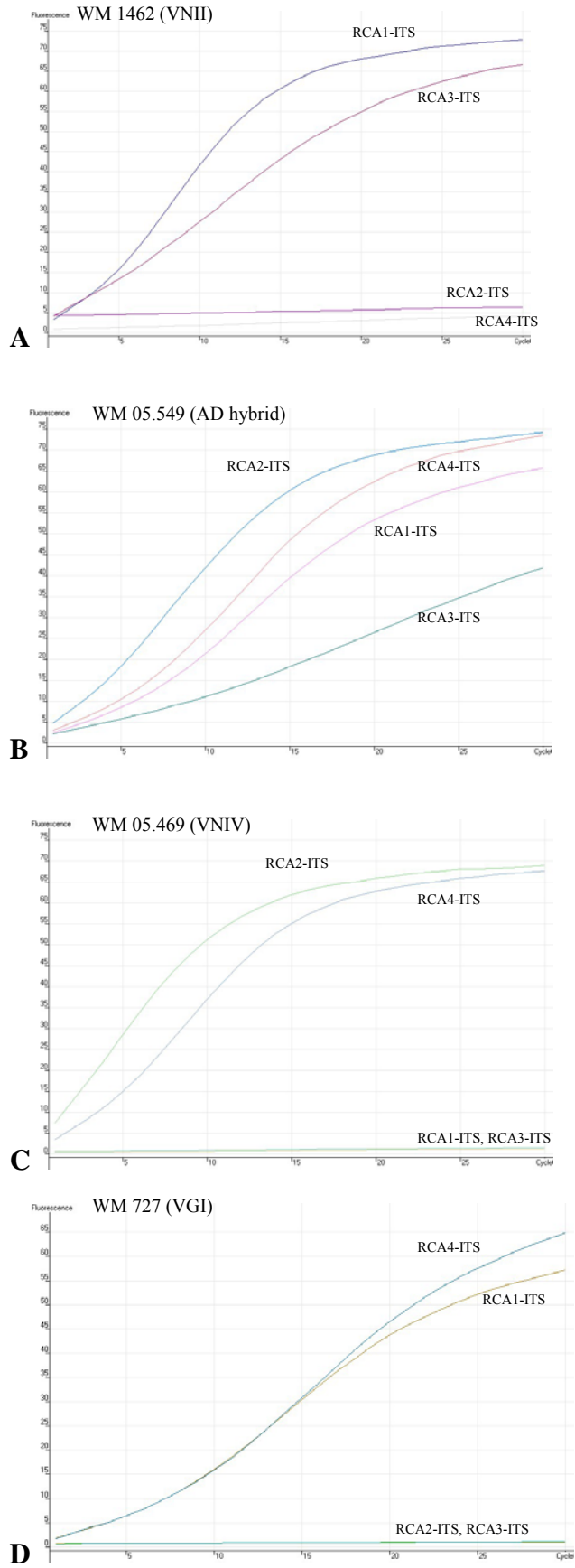


Figure 3.



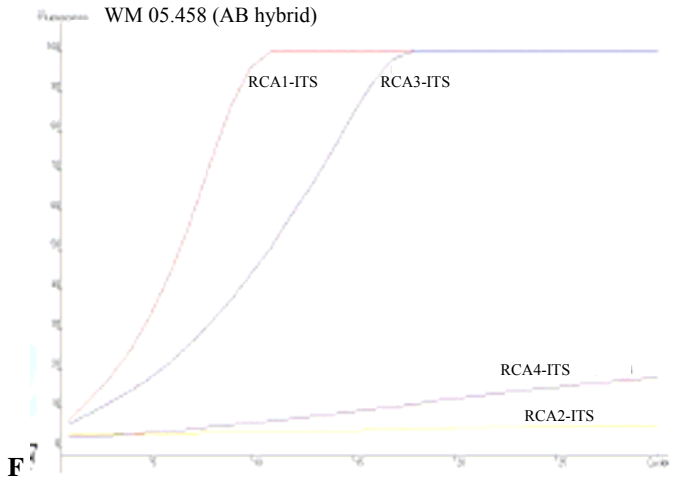
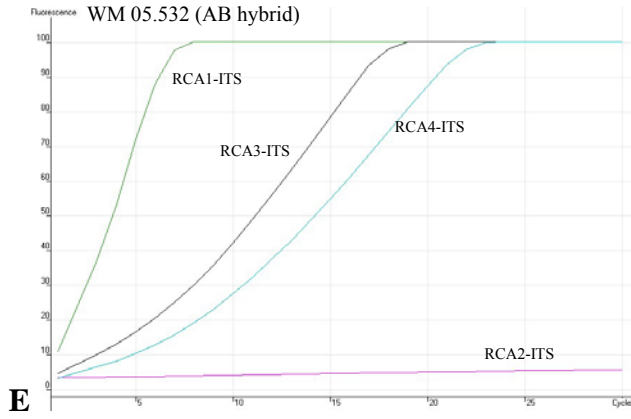
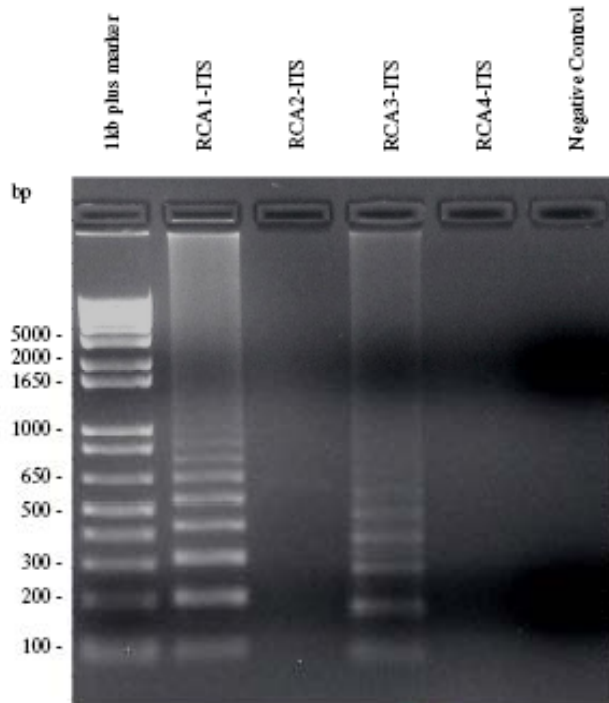


Figure 4.



7 - ARTIGO IV

Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil.

O artigo foi enviado para publicação na revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz” em janeiro de 2008 e, tem como objetivo analisar a variabilidade genética das cepas brasileiras de *C. neoformans* e *C. gattii*, além de correlacionar fenótipos e genótipos com diferentes regiões geográficas e condições do hospedeiro no Brasil.

Running Headline: *Cryptococcus* complex genotypes in Brazil

Title: Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil.

Luciana Trilles (1,3), Márcia dos Santos Lazéra (1), Bodo Wanke (1), Raquel Vasconcelos Oliveira (2), Gláucia Gonçalves Barbosa (1), Bernardina Penarrieta Morales (1), Wieland Meyer (3).

(1) Laboratório de Micologia, IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; (2) Centro de Estatística e Documentação, IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; (3) Molecular Mycology Research Laboratory, Center for Infectious Diseases and Microbiology, Westmead Hospital, Westmead Millennium Institute, University of Sydney, Western Clinical School, Sydney, Australia.

ABSTRACT

The molecular types of 443 Brazilian isolates of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* were analyzed to determine their geographic distribution within Brazil and underlying host conditions. The following data, imported from previous epidemiological studies and from two culture collections, were analyzed: place of isolation, source (clinical or environmental), host risk factors, species, serotype, mating type and molecular type. Molecular typing by PCR-fingerprinting using specific primers for the minisatellite-specific core sequence of the wild-type phage M13 or microsatellites [(GACA)₄, (GTG)₅] and/or *URA5*-RFLP analysis, and/or AFLP

determined 8 major genotypes: VNI/AFLP1, VNII/AFLP1A, VNIII/AFLP2 and VNIV/AFLP3 for *C. neoformans*, and VGI/AFLP4, VGII/AFLP6, VGIII/AFLP5 and VGIV/AFLP7 for *C. gattii*. The most common molecular type found in Brazil was VNI (64%), followed by VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI and VNIV (3% each), and VNIII (< 1%). Primary cryptococcosis caused by the most virulent molecular type VGII, serotype B, MAT α prevails in immunocompetent hosts in the North and Northeast regions, disclosing an endemic regional pattern for this specific molecular type in the Northern regions of Brazil.

KEY WORDS: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, Molecular types, Epidemiology.

SPONSORSHIP: CAPES Foundation, Brazil, and the NH&MRC, Australia, ID 990738 and ID 352303.

CORRESPONDENCE TO: Luciana Trilles, Laboratório de Micologia, IPEC/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: luciana.trilles@ipecc.fiocruz.br.

INTRODUCTION

Cryptococcosis is a life-threatening systemic mycosis affecting humans and animals. It is acquired by inhalation of viable propagules from the environment, with the most common clinical manifestation of cryptococcosis being meningoencephalitis

(Lin & Heitman 2006). Only recently it was recognized that cryptococcosis is caused by two different species of the genus *Cryptococcus*: *C. neoformans* (serotypes A and D, and the hybrid AD) and *C. gattii* (serotypes B and C). While *C. neoformans* infections occur worldwide and is an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised hosts, especially AIDS-patients, *C. gattii* usually infects normal hosts (Lazéra et al. 2005) and is considered a tropical disease. However, the ongoing Vancouver Island outbreak, in a temperate climate, suggests that *C. gattii* has been adapting to new environments (Kidd et al. 2004).

Serotyping was largely used for epidemiological studies of *C. gattii* and *C. neoformans*, but the lack of an available commercial serotyping kit and the search for a more reliable technique led to an increased use of molecular tools. Besides, the analysis of genotypes within a species could answer several questions that may impact the management of therapy as well as surveillance and prophylactic actions. An attempt to standardize a technique for a global molecular epidemiological survey of the agents of cryptococcosis recognized 8 major molecular types by Polymerase Chain Reaction (PCR) fingerprinting, using the minisatellite-specific core sequence of the wild-type phage M13 or microsatellites [(GACA)₄, (GTG)₅]. Thus, *C. neoformans* was grouped into the types VNI (serotype A), VNII (serotype A), VNIII (serotype AD) and VNIV (serotype D); and *C. gattii* was grouped into the types VGI, VGII, VGIII, VGIV (serotypes B and C) (Meyer et al. 1999). This grouping has been confirmed by others using different techniques such as Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Boekhout et al. 2001), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of *URA5* and *PLB1* genes (Latouche et al. 2003, Meyer et al. 2003), and Multilocus Sequence Typing (MLST) (Litvintseva et al. 2006). Recently, AFLP and MLST have

revealed the existence of a new molecular type of *C. neoformans* in Botswana (genotype VNB), which seems to be geographically restricted to sub-Saharan Africa (Litvintseva et al. 2006).

In Brazil, cryptococcosis caused by *C. neoformans* occurs in all regions; however, *C. gattii* behaves as a primary pathogen infecting native immunocompetent hosts, mainly young people and children in the North and Northeast regions of Brazil. In this group of patients, the infection courses with high lethality rates ranging from 40,6% to 56% (Correa et al. 1999, Lazéra et al. 2005) and frequently causes incapacity, such as visual deficit or blindness, and hydrocephalus (Nishikawa et al 2003, Rozenbaum & Gonçalves 1994). The epidemiological data available suggest a geographic macroregional North-South trend in *C. gattii* infections in Brazil: the Northern regions, endemic for *C. gattii*, and the Southern regions, showing only sporadically infections by *C. gattii* (Fig. 1). In this study the molecular types of *C. neoformans* and *C. gattii* isolated in Brazil were analyzed to determine their distribution according to their geographic regions and host conditions.

METHODS

Data were imported from different sources: (1) Previous epidemiological studies (Boekhout et al. 2001, Casali et al. 2003, Igreja et al. 2004, Katsu et al. 2004, Meyer et al. 2003, Trilles et al. 2003, Ribeiro et al. 2006), (2) Database of the Cryptococcal Culture Collection at the Mycology Laboratory at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, and (3) Database of The Australian Medical Fungal Collection (AMFC) at the Molecular Mycology Research Laboratory at Westmead Hospital, Sydney, Australia. Collected data included place of isolation, source (clinical or environmental), host risk factors,

species, serotype, mating type and the molecular type identified by PCR-fingerprinting and/or *URA5*-RFLP analysis and/or AFLP (Boekhout et al. 2001, Meyer et al. 2003, Trilles et al. 2003).

Beside the imported data described above, we performed molecular typing and polymorphism analysis of additional 87 *C. gattii* and *C. neoformans* isolates as follows:

Molecular Typing

The 87 clinical and environmental Brazilian isolates were typed by *URA5*-RFLP analysis and PCR-fingerprinting using the minisatellite-specific core sequence of the wild-type phage M13. The following standard strains representing each molecular type were included in the analysis: WM 148 (serotype A, VNI/AFLP1), WM 626 (serotype A, VNII/AFLP1A), WM 628 (serotype AD, VNIII/AFLP2), WM 629 (serotype D, VNIV/AFLP3), WM 179 (serotype B, VGI/AFLP4), WM 178 (serotype B, VGII/AFLP6), WM 175 (serotype B, VGIII/AFLP5), and WM 779 (serotype C, VGIV/AFLP7) (Meyer et al. 1999).

DNA purification - The DNA was purified as previously described (Meyer et al. 1999). The isolates were grown on Sabouraud's dextrose agar at 37°C for 48 h. A tube containing the yeast cell pellet was frozen in liquid nitrogen. The pellet was ground with a miniature pestle and 500 µL of the cell lysis solution (0,5% sodium dodecyl sulfate, 1,4% NaCl, 0,73% EDTA, Tris-HCl 0,2M) was added to the frozen, ground cells. The tubes were incubated for 5 min at room temperature with constant shaking, and 500 µL phenol:chloroform:isoamyl alcohol (v:v:v 25:24:1) was added

and mixed thoroughly for 2 minutes to obtain a homogenous suspension. The tubes were centrifuged for 20 min at 14,000 rpm. After centrifugation, the upper aqueous layer was transferred to a new tube, an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (v:v 24:1) was added, the mixture was shaken and centrifuged. To precipitate the genomic DNA, an equal volume of isopropanol was added to the supernatant, and the mixture was gently shaken and incubated at -20°C for at least 1 h or overnight. The DNA pellet was washed with 70% ethanol and suspended in 200 μL sterile deionized water at 4°C overnight.

URA5-RFLP analysis - PCR of the URA5 gene was performed in a final volume of 50 μL . Each reaction contained 50 ng of DNA, 1X PCR buffer (160mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670mM Tris-HCl (pH8.8 at 25°C), 0.1% Tween-20 - Biotline), 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Roche Diagnostics GmbH), 3 mM magnesium chloride, 1.5 U BioTaq DNA polymerase (Biotline), and 50 ng of each primer URA5 (5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') and SJ01 (5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') (Meyer et al. 2003). PCR was performed for 35 cycles in a Perkin-Elmer thermal cycler (model 480) at 94°C for 2-min initial denaturation, 45 s of denaturation at 94°C , 1 min annealing at 61°C , and 2 min extension at 72°C , followed by a final extension cycle for 10 min at 72°C . 30 μL of PCR products were double digested with *Sau96I* (10 U/ μL) and *HhaI* (20 U/ μL) for 3 h, and the fragments were separated by 3% agarose gel electrophoresis at 100 V. RFLP patterns were assigned visually by comparing them with the patterns obtained from the standard strains (VNI-VNIV and VGI-VGIV) (Fig. 3A).

PCR-fingerprinting - The amplification reactions were carried out in a volume of 50 μ L containing 25 ng genomic DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each of the dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Mannheim, Germany), 3 mM magnesium acetate, 30 ng primer (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'), and 2.5 U Amplitaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR was performed for 35 cycles in a Perkin-Elmer thermal cycler (model 480) with 20 s of denaturation at 94°C, 1 min annealing at 50°C, and 20 s extension at 72°C, followed by a final extension cycle for 6 min at 72°C. Amplification products were concentrated to approximately 15 μ L and separated by electrophoresis on 1.4% agarose gels stained with ethidium bromide in 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer at 70 V for 9 h, and visualized under UV light (Meyer et al. 2003).

PCR-fingerprinting profiles were visually compared to the standard strains to determine the molecular types (Fig. 3B). The genetic relationships of the isolates were analyzed using the 1D gel analysis module (BioGalaxy [BioAware, Hannut, Belgium]) in BioloMICS version 7.5.30 (BioAware). Similarity coefficients were calculated by using the Dice algorithm, and cluster analysis were performed by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) (Fig. 4).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software SPSS version 11.0, and a p-value <0.05 was used to define significance. The most representative molecular types in numbers of isolates were included in the logistical analysis.

Univariate analysis was performed using the Fisher's exact and chi-square tests. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated to assess the univariate risk of a particular molecular type or specie to occur in certain geographic area.

The variables selected for the current study were source, host factors and region. Host factors were analyzed according to the immunological status of the patient, immunocompetent, HIV negative with no other conditions, and immunodepressive, HIV positive or other conditions (corticotherapy and tumor).

The regional analysis was based on two macro regions: the states of Amazonas (AM), Roraima (RR), Pernambuco (PE), Piauí (PI) and Bahia (BA) represent the Northern region, while the states of Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Paraná (PR) and Rio Grande do Sul (RS) represent the Southern region (Fig. 1).

A multivariate logistic regression model was used to analyse 291 clinical samples, and was calculated with SAS software version 8.0, using the Genmod procedure. The Log-binomial model was used for estimating the adjusted relative risk of the most common molecular type of each species to occur in different host conditions and in different Brazilian regions. The variables, which the Wald test showed $p < 0.05$ were included in the final model. Two models were tested separately: VNI compared to all other molecular types, and VGII compared to all other molecular types, testing the interaction with host factors and macro region.

RESULTS

A total of 443 *C. neoformans* (n=320) and *C. gattii* (n=123) isolates from all Brazilian regions represented by 11 states were analyzed (Fig. 1). The data of 356

isolates were imported from previous studies and 87 isolates were newly typed by using the molecular tools described above. Out of the 320 *C. neoformans* isolates, 251 were clinical and 69 environmental isolates. Out of the 123 *C. gattii* isolates, 86 were clinical (84 human and 2 veterinary), and 37 environmental isolates.

Information on the geographical origin was not available for 3 isolates (0.7%). Mating type data was available for 262 (59.1%) isolates, with 249 (95%) of them being mating type alpha. Ten isolates were mating type **a** (5 VNIV environmental and 5 VGII clinical isolates, all from the Northern region). Host risk factor data were available for 293/335 (87%) clinical isolates. The distribution of the molecular types of the *Cryptococcus* species complex in Brazil, according to geographic region, mating type, source and host factors is shown on Table 1.

Overall, the most common molecular types were VNI (64%) and VGII (21%), followed by VNII (5%), VGIII (4%), VGI and VNIV (3% each), and VNIII (<1%). The molecular type VGIV was not identified among the studied Brazilian isolates.

Univariate analysis of the data set showed that the odds ratio of an isolate being molecular type VNI or VGII, compared with all other molecular types, varied according to the region (North or South of Brazil), when both clinical and environmental data sets were analyzed separately. The molecular type VGII is more likely to occur in the Northern region investigating clinical (OD 9.6, $p < 0.001$) and environmental (OD 2.4, $p < 0.001$) samples. On the contrary, VNI isolates are more likely to occur in the Southern region, showing an OD of 1.5 for both clinical and environmental isolates ($p < 0.001$ and $p = 0.018$, respectively). *C. gattii* is 4.4 times more likely to occur in the Northern, while *C. neoformans* is 1.6 times more likely to

occur in the Southern ($p < 0.001$) region. The distribution of 106 environmental isolates according to molecular types and regions is showed in Figure 2.

The VNI log-binomial model showed a Wald test significance ($p < 0.05$) for host factors, while the region was not important for the occurrence of this molecular type in Brazil ($p > 0.05$). VNI was 5 times more likely to infect immunocompromised host than the other molecular types (Table 2). The interactions showed a significant correlation between host factor and macro region, reflecting a demographic pattern of distribution, where the majority of immunocompromised patients, mainly AIDS patients, live in big cities, the largest ones located in the South. However, the VGII log-binomial model showed a Wald statistic test significance for geographic region and host condition predictors ($p = 0.006$) (Table 3). The relative risk is quite similar to the adjusted relative risk, although it is a little bit higher. Immunocompetent hosts are 10 times more likely to be infected by VGII than by all other molecular types. Similarly, people who live in the North are 16 times more likely to be infected by VGII than people from the South. Nine out of 34 VGII (26%) clinical isolates were associated with HIV infections, being 2 from the North and 7 from the South.

Antifungal susceptibilities of 11 VGI and 28 VGII isolates against 9 drugs were tested previously (Trilles et al. 2004) and the log-mean Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) of both groups were compared using Mann-Whitney test ($p < 0,05$). In the analysis, VGII showed higher mean MICs for fluconazole (2-fold higher), flucitosine (1.5-fold higher), voriconazole (1.3-fold) and albaconazole (1.6-fold) (data not shown).

PCR-fingerprinting using the primer M13 for typing 87 Brazilian isolates grouped them into the major molecular types VNI, VNII, VNIV, VGI and VGII (Figure

4). Overall, the similarity of the *C. neoformans* isolates was 87%, and of the *C. gattii* isolates was 77%. According to the banding pattern, VNI isolates (n=25) were divided into 6 subtypes: one major group comprising 50% of the VNI isolates, three groups with 3 or 4 isolates and two clinical isolates which clustered individually. The VNII isolates (n=3) showed individual patterns. The only three VNIV isolates analysed by PCR-fingerprinting showed a unique, identical, banding patterns. The VGI isolates (n=13) were all from Rio de Janeiro (South) and were divided into one major group (10 isolates), and three clinical isolates showing individual banding patterns. The highest polymorphism was observed among the VGII isolates, showing 14 individual patterns, one major group with eight isolates and a second group with 6 isolates. There was no association between these subtypes and their geographical distribution.

DISCUSSION

Two major epidemiological trends were identified in Brazil: *C. gattii* predominant occurrence in the North (OD 5.4, $p < 0.001$) and a discrete predominance of *C. neoformans* in the South (OD 2.6, $p < 0.001$). These results are in agreement with a phenotypic study of 467 Brazilian *C. neoformans* isolates by Nishikawa et al. (2003), which showed serotype A (*C. neoformans*) associated to the SE region (South) and serotype B (*C. gattii*) associated to the NE region of Brazil (North).

Cryptococcus neoformans is the most common agent of cryptococcosis worldwide, mainly in AIDS patients. In Brazil, over 70% of AIDS patients live in the South and Southeast regions (Brito et al. 2001), where the biggest cities of the country are located and where deforestation and anthropic actions are more evident. Besides, *C. neoformans* has been isolated from bird droppings (mainly from

pigeons), dwellings and wood decay in the urban centers of Brazil (Lazéra et al. 2005, Pedroso et al. 2007). On the contrary, *C. gattii* affects mainly immunocompetent hosts and its natural habitat is predominantly related to wood decay in tropical and subtropical countries. The predominance of *C. gattii* as the main agent of cryptococcosis in the North of Brazil was reinforced by similar result found when the environmental isolates were analyzed (OD 2.3, $p < 0.001$).

In Australia, Chen et al. (2000) and Meyer et al. (2003) proposed that people who live in rural areas of the Northern territory are at higher risk of acquiring cryptococcosis due to their proximity to eucalyptus tree debris. In Brazil, environmental isolates of *C. gattii* correlate to several genera of trees as *Cassia* sp., *Ficus* sp., *Guetarda* sp., *Erythrina* sp., *Licania* sp. (Fortes et al. 2001, Lazéra et al. 2000, Lazéra et al. 1998), and clinical isolates correlate more likely to deforestation areas, mainly on the border of rainforests, representing possibly the highest risk areas for *C. gattii* infections. The practice of cutting down tropical trees and related activities, such as storage, shipping and handling wood byproducts may also represent a risk activity for acquiring cryptococcosis caused by *C. gattii*.

Comparing the molecular types of the North and South of Brazil, no significant differences were observed regarding the occurrence of VNI, while VGII clearly occurs endemically in the North, responsible for 89% of the *C. gattii* infections in that region. In the South, only 43% of the *C. gattii* infections were caused by VGII. Moreover, the majority of the VGII clinical isolates in Rio de Janeiro were obtained from patients coming from the NE region of Brazil (Rozenbaum & Gonçalves 1994, Lazéra, personal communication), who went to the large cities of the South looking for better life conditions. Probably the same is in part the reason for the VGII clinical isolates

obtained in other cities, mainly São Paulo, the most important center of internal migration in Brazil. Thus, considering the large inland migration, the molecular types of clinical origin of a certain region should be correlated with the molecular typing of the environmental isolates of that region. In the present study, out of the 37 *C. gattii* environmental isolates, 36 were isolated in the North, all of them being VGII, reinforcing its predominance in this region. The only environmental *C. gattii* isolate obtained in the South was molecular type VGI. However, the molecular type VGI was not detected among the clinical and environmental isolates from the North, suggesting that this type may occur in higher latitudes of tropical or subtropical regions. Similar results were described by Escandón et al. (2006), in Colombia, where out of 425 isolates of the *Cryptococcus* species complex only one was identified as VGI, and the majority (99.2%) of the *C. gattii* isolates were molecular type VGII. Recent molecular typing studies in Brazil have shown the presence of VNI and VNII in clinical samples, VNI, VNIV and VGI in environmental samples in the South (states of São Paulo and Rio Grande do Sul) (Abegg et al. 2006, Matsumoto et al. 2007, Ribeiro et al. 2006). In addition, the Brazilian isolates showed a high polymorphism (77%) among the VGII isolates.

Our results show that in South America, mainly in the Northern part of the continent, the population is constantly exposed to the VGII molecular type of *C. gattii*. Curiously the same type is responsible for the Vancouver Island epidemic of cryptococcosis, in Canada, which started in 1999 and now is becoming endemic in that high latitude.

Mat alpha cells are more virulent than Mat a cells, and predominate in clinical and environmental samples worldwide, as also observed in the present study. In the

Northern Brazilian region, VGII Mat **a** was identified as agent of systemic cryptococcosis in 5 immunocompetent patients. These findings denote an uncommon picture of the pathogenesis of cryptococcosis and deserve more studies to elucidate the impact of the mating locus in *C. gattii* infections. Only Mat alpha strains have been isolated in British Columbia, Canada, where VGII is the major genotype associated to the outbreak.

Considering that the VGII molecular type existed in Brazil long before the British Columbia outbreak and that we have identified both mating types Mat alpha and Mat **a** geographically closely together, we suggest the possibility of the occurrence of genetic recombination among those yeast populations in South America and, consequently, spreading in the environment as adapted polymorphic populations.

Despite conventional treatment, infections with *C. gattii* present significant mortality and relapse rates (Harrison 2000). A recent study demonstrated that *C. gattii* clinical isolates were less susceptible than *C. neoformans* to fluconazole, voriconazole, itraconazole and ravuconazole (Trilles et al. 2004). In the present analysis, VGII showed to be less susceptible than VGI isolates to fluconazole, suggesting susceptibility differences among different molecular types of *C. gattii*. Considering the relative low number of VGII and VGI isolates analyzed, further comparative studies on isolates of the VG molecular types in relation to susceptibility and correlation between the clinical response and the antifungal drugs are necessary.

The first VGII strain (LMM 293) identified in Brazil was isolated in Rio de Janeiro, in 1988, from a patient coming from the North. Brazil is a large continental

country with different geographic and demographic patterns. In the Northern region, the Amazonian rainforest encompasses partially preserved wild areas surrounding urban cities or settlements. In the Northeast, the central semi-arid region is covered by brushwood, known as “caatinga”. Between the occidental Amazonian rainforest and the NE savanna exists a transitional area, mainly represented by the Maranhão and Piauí states. Our results showed the occurrence of *C. gattii* VGII in the environment of both regions, behaving as a primary pathogen of human infection in native, normal hosts, causing mostly meningoencephalitis, attaining 20 to 30% children and adolescents.

A recent diagnosis (2006) of meningoencephalitis due to a VGII strain in a 5 year old child, who lived lifelong in Rio de Janeiro (not included in the present analysis), may suggest that the VGII type spread from the North and adapted to new areas in the South of Brazil due to anthropic activity and/or global climatic changes. It is also possible that this molecular type is present in low density since a long time in the South of Brazil, thus causing occasional human cases. It has been suggested that *C. gattii* VGII has recently colonized the temperate region of Vancouver Island by unknown events, and the forestry activities and the distribution of tree by-products may have facilitated the mobility of *C. gattii* through aerosolization and mechanical dispersal to non-endemic areas within the Pacific Northwest (Fraser et al. 2005, Kidd et al. 2007, Upton et al. 2007). This emphasizes the need of an active surveillance program of new human and/or animal infections by VGII strains in the South.

It is a very important point that VGII is not a rare genotype of *C. gattii* in South America. In fact, it behaves as a primary fungal pathogen causing endemic cryptococcosis in immunocompetent hosts in the Northern regions of Brazil, where it

is well adapted to the environment, especially in biotopes associated to wood decay. Our findings point out that this eco-epidemiological pattern of the VGII genotype in Brazil is not a recent event and has been recognized for at least the last 20 years.

Acknowledgments: We thank the CAPES Foundation, Brazil, and the NH&MRC, Australia, ID 990738 and ID 352303 for the financial support to LT and WM respectively.

BIBLIOGRAPHY:

Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH 2006. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia* 161(2):83-91.

Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, Dromer F, Meyer W 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147:891-907.

Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL 2001. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev Soc Bras Med Trop* 34:207-217.

Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res* 3:405-415.

Chen YC, Chang SC, Shih CC, Hung CC, Luhbd KT, Pan YS, Hsieh WC 2000. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 36(3):175-83.

Correa MP, Oliveira EC, Duarte RR, Pardal PP, Oliveira FM, Severo LC 1999. Cryptococcosis in children in the State of Para, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32:505-508.

Escandon P, Sanchez A, Martinez M, Meyer W, Castaneda E 2006. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res* 6:625-635.

Fortes ST, Lazéra MS, Nishikawa MM, Macêdo RCL, Wanke B 2001. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycosis* 44:137-140.

Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J 2005. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 437:1360-1364.

Harrison TS 2000. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. *J Infect* 41:12-17.

Igreja RP, Lazéra MS, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W 2004. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Med Mycol* 42:229-238.

Katsu M, Kidd S, Ando A, Moretti-Branchini ML, Mikami Y, Nishimura K, 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 SE, Bach PJ, Hingston AO, Mak S, Chow Y, MacDougall L, Kronstad JW, Bartlett KH 2007. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. Emerg Infect Dis 13(1):51-57.

Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci USA 101:17258-17263.

Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC, Meyer W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates 2003. Appl Environ Microbiol 69(4):2080-2086.

Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Micol 38:379-383.

Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B 1998. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow - evidence for a natural habitat related to decaying wood. J. Med. Vet. Mycol 36:119-122.

Lazéra MS, Gutierrez-Galhardo MC, Cavalcanti MAS, Wanke B 2005. Criptococose. In: JR Coura, Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Guanabara Koogan S. A, Rio de Janeiro, p. 1223-1236.

Lin X & Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex 2006. Annu Rev Microbiol 60:69-105.

Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG 2006. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. Genetics 172(4):2223-2238.

Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, Melhem MS, Medes-Giannini MJ 2007. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 49(1):41-47.

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E; IberoAmerican Cryptococcal Study Group 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis 9:189-195.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofina M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC 1999. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis 20:1790–1799.

Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, Bezerra CC, Pérez MA, Cardarelli P, Wanke B 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 41(1):73-77.

Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC 2007. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Res* [*in press*].

Ribeiro AM, Silva LKR, Schrank IS, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH 2006. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. *Med. Mycol* 44:707-713.

Rozenbaum R, Gonçalves AJ 1994. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin Infect Dis* 18:369-380.

Trilles L, Lazera MS, Wanke B, Theelen B, Boekhout T 2003. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med Mycol* 41:383-390.

Trilles L, Fernández-Torres B, Lazera MS, Wanke B, Guarro J 2004. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J. Clin. Microbiol* 42:4815-4817.

Upton A, Fraser JA, Kidd SE, Bretz C, Bartlett KH, Heitman J, Marr KA 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(9):3086-3088.

Table 1. Characteristics of 443 Brazilian isolates included in this study.

Characteristics	Molecular Types - N (%)							Total
	VGI	VGII	VGIII	VNI	VNII	VNIII	VNIV	
Geographic region								
Northern	-	68 (63.6)	4 (3.7)	30 (28)	-	-	5 (4.7)	107
Southern	14 (4.2)	24 (7.2)	12 (3.6)	252 (75.4)	22 (6.6)	1 (0.3)	9 (2.7)	334
Mating Type								
Alpha	9 (3.6)	63 (25.3)	12 (4.8)	151 (60.6)	5 (2.0)	-	9 (3.6)	249
A	-	5 (50)	-	-	-	-	5 (50)	10
Alpha/a	-	-	-	3 (100)	-	-	-	3
Source								
Clinical	14 (4.2)	54 (16.1)	16 (4.8)	234 (69.9)	17 (5.1)	-	-	335
Environmental	1 (0.9)	36 (34)	-	49 (46.2)	5 (4.7)	1 (0.9)	14 (13.2)	106
Veterinary		2 (100)						2
Host Factors								
Immunocompetent	5 (11.9)	25 (59.5)	6 (14.3)	6 (14.3)	-	-	-	42
Immunocompromised	-	9 (3.6)	3 (1.2)	222 (88.4)	17 (5.8)	-	-	251

Table 2. Logistic regression model of probability of VNI occurrence in clinical samples (N = 291).

Characteristics	Relative Risk (95% CI)	p-value	Adjusted Relative Risk (95% CI)	p-value
HOST STATUS				
Immunocomprised	2.18 (1.7-2.9)	<0.001	6.19 (3.0-13.0)	< 0.001
Immunocompetent	1.00	-	1.00	-

Table 3. Logistic regression model of probability of VGII occurrence in clinical samples with interactions between the predictors host status and macro region (n=291).

Characteristics	Risk Relative (95% CI)	p-value	Adjusted Risk Relative (95% CI)	p-value
HOST STATUS				
Immunocompetent	11.20 (6.8-18.5)	<0.001	11.71(4.4-31.2)	<0.001
Immunocomprised	1.00	-	1.00	-
MACRO REGION				
North	16.0 (8.4-30.7)	<0.001	17.57(5.2-59.6)	<0.001
South	1.00	-	1.00	-
HOST STATUS * MACRO REGION				
Immunocompetent*North		-	0.14 (0.03-0.57)	0.006
Immunocompetent *South	-	-	1.00	
Immunocomprised*North	-	-	1.00	
Immunocomprised*South	-	-	1.00	

Figure Legends:

Figure 1 - Map of Brazil showing the two macro regions with the states involved in this study, number of isolates and the molecular types.

Figure 2 - Molecular types of the environmental isolates according to macro regions.

Figure 3 – **(A)** *URA5* gene restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles identified by double digest of the gene with *Sau96I* and *HhaI* of the standards isolates; **(B)** Banding pattern generated by polymerase chain reaction (PCR) fingerprints with the primer M13.

Figure 4 - Phenogram of PCR-fingerprinting profiles of 87 Brazilian isolates obtained using the primer M13. The isolates clustered into 5 major molecular types: VNI, VNII and VNIV – *C. neoformans*; and VGI and VGII – *C. gattii*.

Table 1. Characteristics of 443 Brazilian isolates included in this study.

Characteristics	Molecular Types - N (%)							Total
	VGI	VGII	VGIII	VNI	VNII	VNIII	VNIV	
Geographic region								
Northern	-	68 (63.6)	4 (3.7)	30 (28)	-	-	5 (4.7)	107
Southern	14 (4.2)	24 (7.2)	12 (3.6)	252 (75.4)	22 (6.6)	1 (0.3)	9 (2.7)	334
Mating Type								
Alpha	9 (3.6)	63 (25.3)	12 (4.8)	151 (60.6)	5 (2.0)	-	9 (3.6)	249
A	-	5 (50)	-	-	-	-	5 (50)	10
Alpha/a	-	-	-	3 (100)	-	-	-	3
Source								
Clinical	14 (4.2)	54 (16.1)	16 (4.8)	234 (69.9)	17 (5.1)	-	-	335
Environmental	1 (0.9)	36 (34)	-	49 (46.2)	5 (4.7)	1 (0.9)	14 (13.2)	106
Veterinary	-	2 (100)	-	-	-	-	-	2
Host Factors								
Immunocompetent	5 (11.9)	25 (59.5)	6 (14.3)	6 (14.3)	-	-	-	42
Immunocompromised	-	9 (3.6)	3 (1.2)	222 (88.4)	17 (5.8)	-	-	251

Table 2. Logistic regression model of probability of VNI occurrence in clinical samples (N = 291).

Characteristics	Relative Risk (95% CI)	p-value	Adjusted Relative Risk (95% CI)	p-value
HOST STATUS				
Immunocomprised	2.18 (1.7-2.9)	<0.001	6.19 (3.0-13.0)	< 0.001
Immunocompetent	1.00	-	1.00	-

Table 3. Logistic regression model of probability of VGII occurrence in clinical samples with interactions between the predictors host status and macro region (n=291).

Characteristics	Risk Relative (95% CI)	p-value	Adjusted Risk Relative (95% CI)	p-value
HOST STATUS				
Immunocompetent	11.20 (6.8-18.5)	<0.001	11.71(4.4-31.2)	<0.001
Immunocomprised	1.00	-	1.00	-
MACRO REGION				
North	16.0 (8.4-30.7)	<0.001	17.57(5.2-59.6)	<0.001
South	1.00	-	1.00	-
HOST STATUS * MACRO REGION				
Immunocompetent*North		-	0.14 (0.03-0.57)	0.006
Immunocompetent *South	-	-	1.00	
Immunocomprised*North	-	-	1.00	
Immunocomprised*South	-	-	1.00	

Figure 1.

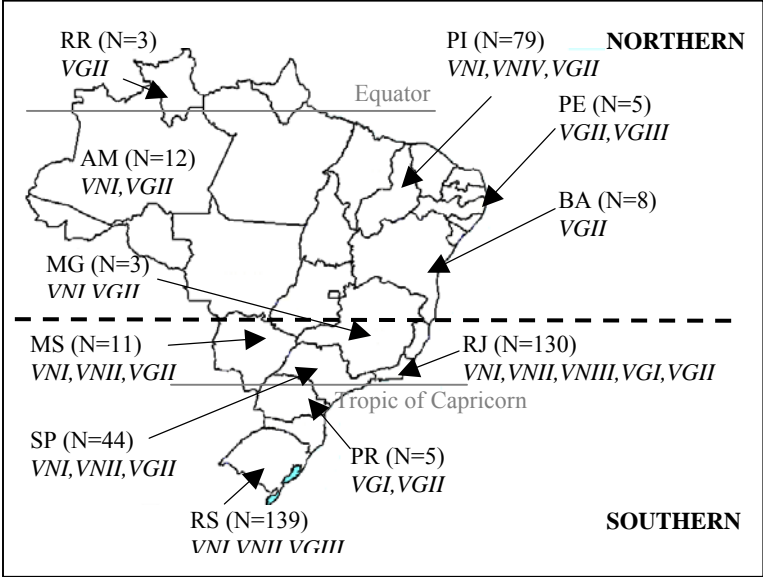


Figure 2.

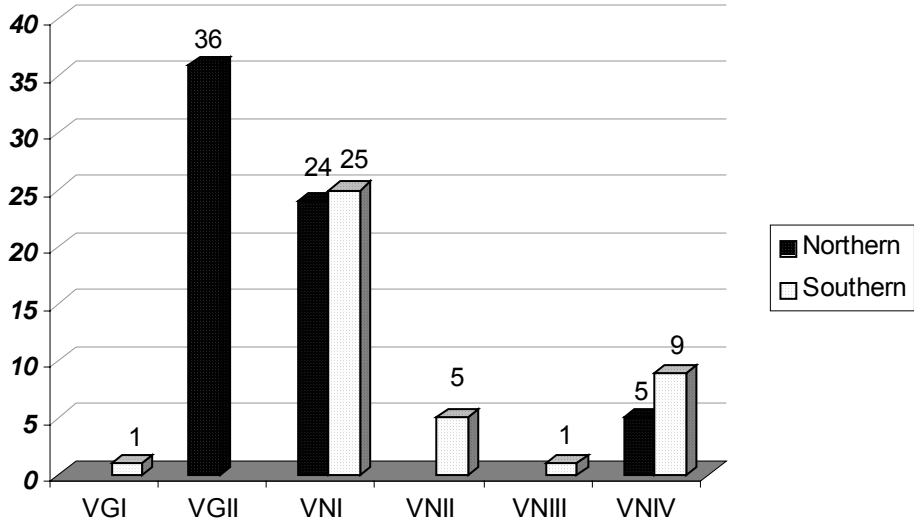
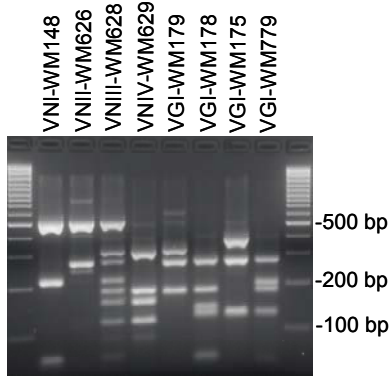


Figure 3

A.



B.

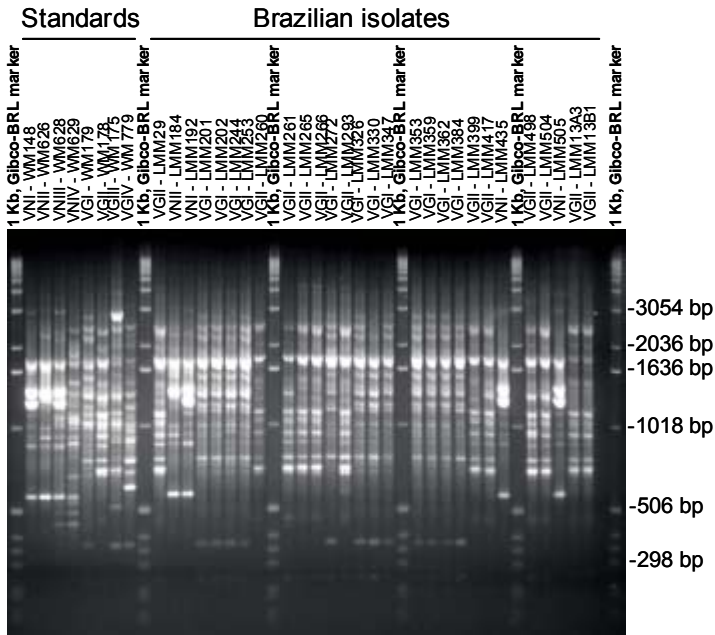
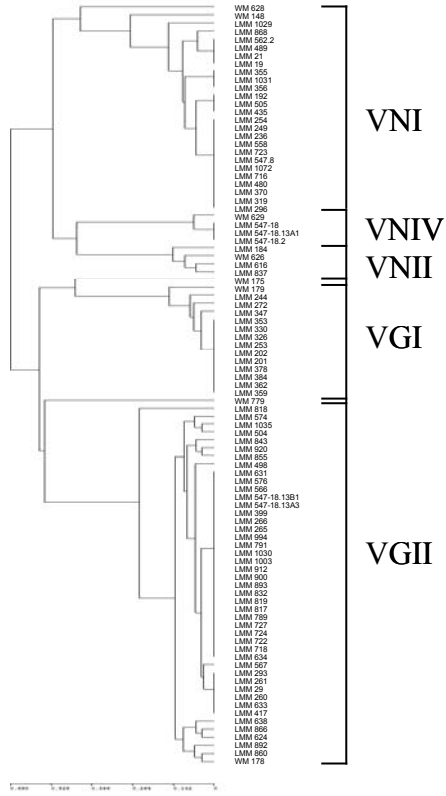


Figure 4.



8 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Criptococose é causada por duas espécies de leveduras, *C. neoformans* e *C. gattii*. De modo geral, *C. neoformans* é mais comumente identificada tanto em amostras clínicas como em amostras ambientais, o que faz com que a espécie *C. neoformans* seja utilizada como modelo nos estudos da criptococose e seus agentes, bem como em ensaios clínicos de terapia antifúngica.

No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose de SNC por *C. gattii* em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões N e NE, com letalidade de 35% a 40% (Correa e col., 1999, Santos 2000, Nishikawa et al. 2003, Martins 2004). Chama atenção a importância das manifestações do SNC sem a contra-partida de formas clínicas mais brandas, o que pode indicar um sub-diagnóstico da doença na região ou uma maior virulência por parte de *C. gattii* no hospedeiro humano. A importância da criptococose por *C. gattii* é crescente; se antes era vista como problema restrito a grupos populacionais rurais ou nativos, atualmente identifica-se sua ocorrência em diversas regiões onde surjam condições laboratoriais para o diagnóstico e discriminação das espécies de *Cryptococcus*.

Nos testes de suscetibilidade *in vitro* do primeiro trabalho (artigo I), foi observado que *C. gattii* é menos suscetível à maioria das drogas testadas, fluconazol, itraconazol, albaconazol, cetoconazol, ravuconazol, voriconazol e micafungina. Outros autores verificaram que a resposta clínica ao tratamento com antifúngicos em infecções por *C. gattii* é mais lenta e apresenta maior número de recaídas que infecções por *C. neoformans* (Yee-Chun e col., 2000; Harrison, 2000). Drogas ainda em fase de teste como albaconazol e ravuconazol apresentaram maior atividade *in vitro* frente a *C. neoformans* e *C. gattii*, enquanto que dentre as comercializadas, voriconazol, itraconazol e anfotericina B foram as drogas com maior atividade *in vitro*. A dosagem nos tratamentos das infecções fúngicas é limitada pela toxicidade dos antifúngicos disponíveis no mercado, portanto deve-se ampliar os estudos para a identificação de novos alvos terapêuticos e de correlação clínica, principalmente com relação à *C. gattii*, por ser mais resistente do que *C. neoformans*.

A droga micafungina, possui baixa toxicidade por ser uma equinocandina, que age em moléculas ausentes nas células eucarióticas. Entretanto, a micafungina apresenta boa resposta terapêutica apenas para espécies de *Cândida* spp. e *Aspergillus* spp. Apesar da baixa ou nenhuma atividade antifúngica frente a *C. neoformans* e *C. gattii* como demonstrado no primeiro trabalho, o segundo artigo demonstrou interação sinérgica da micafungina com anfotericina B para a maioria dos isolados testados, ocorrendo diminuição da CIM em até 5 diluições. Os resultados indicam uma nova possibilidade de tratamento para a criptococose, porém estudos em modelos animais são necessários para a confirmação da eficácia da combinação de tais drogas. Este conjunto de dados vem reforçar a visão atual de terapia antifúngica combinada (anfotericina B e 5 fluorocitosina) para a criptococose em casos graves, com elevada carga fúngica e ou imunodeprimidos. Há portanto necessidade de dar continuidade a estudos prospectivos *in vivo* e *in vitro* de combinações de drogas antifúngicas, particularmente na criptococose *gattii*, que carece principalmente de estudos *in vivo*.

As diferenças fisiológicas entre *C. neoformans* e *C. gattii* permite a utilização de um meio de cultura (CGB - canavanina-glicina-azul de bromotimol) para a diferenciação das duas espécies. A metodologia é simples, porém o teste se estende por no mínimo 8 dias, sendo que são observados alguns resultados duvidosos. Faz-se necessária a introdução de uma metodologia sensível e que possa ser realizada em curto espaço de tempo para se obter um diagnóstico precoce e preciso.

Nos últimos anos, isolados clínicos e ambientais expressando fenótipo de ambas as espécies foram repetidamente observados. Tais achados podem representar mais do que uma infecção mista. Esses isolados mostram reatividade simultânea capsular de *C. gattii* e *C. neoformans*, resultando em cepas “não típáveis” como os sorotipos BD ou AB. Tais fenótipos atípicos merecem uma análise genética detalhada, considerando a possibilidade de hibridização sexuada ou parasexuada entre as duas espécies. Os aspectos de reprodução, gerando variabilidade, seja por recombinação sexuada, parassexualidade ou mutação, são fundamentais para o entendimento da produção de genótipos virulentos, da suscetibilidade a drogas e da relação parasita-hospedeiro. Foi verificado que isolados sorotipos AD são resultantes do cruzamento ou hibridização entre os isolados sorotipo A e D (Kwon-Chung & Varma, 2006). O mesmo já foi sugerido entre os sorotipos D e B após análise de alguns isolados sorotipo DB com AFLP (Bovers e col., 2006). A técnica de RCA (rolling circle amplification) com a utilização de sondas específicas mostrou-se rápida, sensível e de boa reprodutibilidade, demonstrando ser

ferramenta útil no laboratório clínico para diagnóstico dos agentes da criptococose, pois foi capaz de identificar as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, e também distinguir os tipos moleculares VNI/VNII, VNIII, VNIV e VGI-VGIV. Além do mais, RCA foi capaz de identificar os isolados híbridos AD (VNIII) e os possíveis isolados brasileiros híbridos AB, os quais, posteriores estudos genéticos deverão confirmar como híbridos ou apenas culturas mistas. Além do mais, é de grande interesse a aplicação de tal metodologia na identificação de fungos agentes de micoses sistêmicas de crescimento lento ou de risco 3 como *Coccidioides immitis/posadasii* e *Histoplasma capsulatum*. Porém, são necessários futuros estudos com número maior de amostras.

A análise dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* no Brasil demonstrou que todos os tipos moleculares de *C. neoformans* estão presentes no país e que o mais comum deles, VNI se comporta como em todo o mundo, infectando principalmente hospedeiros imunocomprometidos. Quanto aos tipos moleculares de *C. gattii*, VGI, VGII e VGIII ocorrem no país, sendo que para o tipo mais comum, VGII Mat alfa, foi observada associação estatisticamente significativa com as regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde ocorre de forma endêmica e como agente de infecção primária em hospedeiros imunocompetentes nativos da região. Este tipo molecular, VGII, além de ser o responsável pela única epidemia humana de criptococose já registrada, é mais resistente a algumas drogas antifúngicas (fluconazol, itraconazol, ravuconazol e voriconazol) do que o tipo VGI, tipo mais comum no mundo. Tais resultados indicam a necessidade de estudos de virulência e suscetibilidade *in vivo* do VGII, bem como do monitoramento do surgimento do VGII em áreas como o Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

9 - CONCLUSÕES

- *C. gattii* é mais resistente do que *C. neoformans* frente a várias drogas, portanto há a necessidade de um maior investimento na identificação de novos alvos terapêuticos, para a produção de drogas menos tóxicas e mais eficazes.
- A micafungina, apesar de não apresentar atividade *in vitro* frente a *C. neoformans* e *C. gattii*, pode se tornar uma boa opção para o tratamento da criptococose quando em combinação com outras drogas, principalmente anfotericina B, porém ainda são necessários estudos de correlação clínica para confirmar os resultados *in vitro*.
- A técnica de RCA com sondas específicas foi sensível, rápida e de boa reprodutibilidade na identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*, podendo ainda identificar híbridos AD e os possíveis híbridos AB. Estudos posteriores são necessários para verificar a eficácia desta técnica no diagnóstico clínico. O tipo molecular mais comum de *C. neoformans* no Brasil, VNI, se comporta como em todo mundo, infectando principalmente hospedeiros imunocomprometidos. Já com relação a *C. gattii*, existem diferentes padrões regionais, estando o VGI associado às regiões Sul e Sudeste e o VGII associado às regiões Norte e Nordeste. A maior resistência de *C. gattii* frente albaconazol, fluconazol, fluorocitosina e voriconazol provavelmente é devido ao tipo molecular VGII, pois se mostrou mais resistente do que VGI nos testes *in vitro*.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*. 2006;161(2):83-91.

Aller AI, Claro R, Castro C, Serrano C, Colom MF, Martín-Mazuelos E. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in HIV-infected patients to fluconazole, itraconazole and voriconazole in Spain: 1994-1996 and 1997-2005. *Chemotherapy*. 2007;53(4):300-5.

Alsbaugh JA, Cavallo LM, Perfect JR, Heitman J. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2000; 36(2):352-65.

Aulakh HS, Straus SE & Kwon-Chung KJ. Genetic relatedness of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) and *Filobasidiella bacillispora* (*Cryptococcus gattii*) as determined by deoxyribonucleic acid base composition and sequence homology studies. *Int J Syst Bacteriol*. 1981; 31:97-103.

Barbosa G, Alvarez C, Morales B, Trilles L, Wanke B, Lazéra M. Persistência de *Cryptococcus neoformans* sorotipo A em oco de *Cassia grandis* por 15 anos e associação com *Cryptococcus gattii*. 5º Congresso de Micologia, Recife. 2007; MM-207.

Baró T, Torres-Rodríguez JM, De Mendoza MH, Morera Y, Alía C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):458-461.

Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 2001; 147:891-907.

Boekhout TA, van Belkum, Leenders ACAP, Verbrugh HA, Mukamurangwa P, Swinne D, Scheffers WA. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: Taxonomic and epidemiological aspects. *Int J Syst Bacteriol*. 1997; 47:432-442.

Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit AC, Savelkoul PH. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:1357-1362.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, Hoogveld HL, Boekhout T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(4):599-607.

Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill RJ, Pappas PG, Reingold AL, Rimland D, Warnock DW; Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(11):3065-3069.

Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill RJ, Pappas PG, Reingold AL, Rimland D, Warnock DW for the cryptococcal disease active surveillance group. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the US: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antim. Agents and Chemotherapy.* 2001; 45:3065-3069.

Casadevall A & Perfect. Introduction to the pathogen. In: Casadevall & JR Perfect (ed.), *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington DC. 1998.

Chang IC, Penoyer L & Kwon-Chung KJ. The second *STE12* homologue of *Cryptococcus neoformans* is MATa-specific and plays an important role in virulence. *PNAS.* 2001; 98:3258-63.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol.* 1994;14(7):4912-4919.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1998;66(5):2230-2236.

Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun.* 1996;64(6):1977-1983.

Cooney EL. Clinical indicators of immune restoration following highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34(2):224-33.

Correa MPC, Oliveira EC, Duarte RRBS, Pardal PPO, Oliveira FM, Severo LC. Criptococose em crianças no estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32:505-508.

Cox GM & Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon* species. In: L Ajello and RJ Hay (ed.), *Microbiology and Microbial infections*. Vol. 4. Topley & Wilson's (Collier L, Balows, Sussman M) Oxford University Press, New York. 1998.

Currie BP, Freundlich LF, Casadevall A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. *J Clin Microbiol.* 1994;32(5):1188-1192.

Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, Michel-Nguyen A, Piens MA, Favel A, Lortholary O, Dromer F; French Cryptococcosis Study Group. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(7):2464-70.

Darzé C, Lucena R, Gomes I, Melo A. Características clínicas e laboratoriais de 104 casos de meningite criptocócica. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.* 2000; 33:21-26.

Del Poeta M, Schell WA, Perfect JR. In vitro antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1997; 41:1835-1836.

Demidov VV. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2002;2(6):89-95.

Dias AL, Matsumoto FE, Melhem MS, da Silva EG, Auler ME, de Siqueira AM, Paula CR. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *J Med Microbiol.* 2006; 55:1693-9

Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, Fell JW. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *System Appl Microbiol* 2000; 23: 535-545.

Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. *Clin Infect Dis.* 1996 Jul;23(1):82-90.

Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:415-429.

Ellis D, Marriott D, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol.* 2000;38:173-82.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet.* 1990; 336:923-925.

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 Res.* 2006;6(4):625-35.

Fan M, Currie BP, Gutell RR, Ragan MA, Casadevall A. The 16S-like, 5.8S and 23S-like rRNAs of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*: sequence, secondary structure, phylogenetic analysis and restriction fragment polymorphisms. *J Med Vet Mycol.* 1994;32(3):163-180.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50(3):1351-1371.

Fortes ST, Lazéra MS, Nishikawa MM, Macêdo RCL, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycosis* 2000; 44:137-140.

Fortes ST. Fontes sapróbias e sexualidade de isolados clínicos e ambiental de *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans* do estado de Roraima – Brasil. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Tese de Doutorado, 2001.

Franzot SP, Hamdan JS, Currie BP, 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. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2243-2251.

Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(3): 838–840.

Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez-Tudela JL. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(5):336-340.

Gezuele E, Calegari L, Sanabria D, Davel G, Civilia E. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. *Rev Iberoam Micol*. 1993; 10:5-6.

Ghannoum M. Potencial role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Reviews*. 2000; 13:122-143.

Girmenia C, Cimino G, Micozzi A, Gentile G, Martino P. Risk factors for nephrotoxicity associated with conventional amphotericin B therapy. *Am. J. Med*. 2002; 113:351.

González AE, Martínez AT, Almendros G, Grinbergs J. A study of yeasts during the delignification and fungal transformation of wood into cattle feed in Chilean rain forest. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1989;55:221-236.

Harrison TS. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. *J Infect*. 2000 Jul;41(1):12-7.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007;111:509-547.

Hsieh SM, Hung CC, Chen MY, Hsueh PR, Chang SC. Efficacy and adverse effects of higher dose amphotericin B monotherapy for cryptococcal meningitis in patients with advanced HIV infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. 1998; 31:233-239.

- Igreja RP, Lazéra Mdos S, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Med Mycol.* 2004;42(3):229-238.
- Ikeda R, Shinoda T, Morita T, Jacobson ES. Characterization of a phenol oxidase from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Microbiol Immunol.* 1993;37(10):759-764.
- Jung WH, Sham A, White R, Kronstad JW. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol.* 2006;4(12):e410.
- Karaoglu H, Lee CM, Meyer W. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. *Mol Biol Evol.* 2005;22(3):639-649.
- Khan ZU, Randhawa HS, 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. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):312-316.
- Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101(49):17258-17263.
- Kohn LM. Mechanisms of fungal speciation. *Annu Rev Phytopathol.* 2005;43:279-308.
- Kong F, Tong Z, Chen X, Sorrell T, Wang B, Wu Q, Ellis D, Chen S. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling circle amplification. *J Clin Microbiol.* 2008; in press.
- Kovacs JA, Kovacs AA, Polis M, Wright WC, Gill VJ, Tuazon CU, Gelmann EP, Lane HC, Longfield R, Overturf G, Macher AM, Fauci AS, Parrillo JE, Bennett JE, Masur H. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals Int Med.* 1985; 103:533-538.
- Kozel TR. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 1995; 3:265-299.
- Krockenberger MB, Canfield PJ, Malik R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by *C n.* var. *gattii* and investigation of environmental sources. *Med Mycol.* 2002;40(3):263-272.
- Kwon-Chung KJ & Bennett JE. Cryptococcosis. In: Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. 1992.
- Kwon-Chung KJ & Rhodes JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1986; 51:218-223.
- Kwon-Chung KJ & Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(4):574-87.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE & Rhodes JC. Taxonomic studies on *Filobasidiella neoformans* and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek* 1982; 48:25-38.

Kwon-Chung KJ, Lazéra MS, Chang Y, Kang BS. Is *Cryptococcus neoformans* evolving into an asexual organism, abst I.37:93. 4th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, London. 1999.

Kwon-Chung KJ, Pfeiffer T, Chang YC, Wickes BL, Michell D, Stern JJ. Molecular biology of *Cryptococcus neoformans* and therapy of cryptococcosis. *J Med Vet Mycol* 1994; 32:407-415.

Kwon-Chung KJ. Distribution of α and a mating type of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol* 1978; 108: 337-40.

Kwon-Chung, KJ & Bennett, JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol*.1984.35:270-272.

Kwon-Chung, KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellonycetidae). *Taxon*. 2002; 51:804-806.

Larsen RA, Bauer M, Brouwer AE, Sanchez A, Thomas AM, Rajanuwong A, Chierakul W, Peacock SJ, Day N, White NJ, Rinaldi MG and Harrison TS. In Vitro-Clinical Correlations for Amphotericin B Susceptibility in AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:343-345.

Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM & Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Micol*. 2000; 38:379-383.

Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow - evidence for a natural habitat related to decaying wood. *J Med Vet Mycol* 1998; 36: 119-122.

Lazéra MS, Gutierrez-Galhardo MC, Cavalcanti MAS., Wanke B. Criptococose. In: Coura JR. (Ed.) Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2005, 1223-1236.

Lazéra MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Micol* 1996; 34:127-131.

Le Gac M, Hood ME, Giraud T. Evolution of reproductive isolation within a parasitic fungal species complex. *Evolution Int J Org Evolution*. 2007;61(7):1781-1787.

Lengeler KB, Wang P, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. Identification of the MAT a mating type locus of *Cryptococcus neoformans* reveals a serotype A MAT a strain thought to have been extinct. *PNAS*. 2000; 97:14455-14460.

Lindberg J, Hagen F, Laursen A, Stenderup J, Boekhout T. *Cryptococcus gattii* risk for tourists visiting Vancouver Island, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(1):178-179.

Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA, Allen JE, Bosdet IE, Brent MR, Chiu R, Doering TL, Donlin MJ, D'Souza CA, Fox DS, Grinberg V, Fu J, Fukushima M, Haas BJ, Huang JC, Janbon G, Jones SJ, Koo HL, Krzywinski MI, Kwon-Chung JK, Lengeler KB, Maiti R, Marra MA, Marra RE, Mathewson CA, Mitchell TG, Perteau M, Riggs FR, Salzberg SL, Schein JE, Shvartsbeyn A, Shin H, Shumway M, Specht CA, Suh BB, Tenney A, Utterback TR, Wickes BL, Wortman JR, Wye NH, Kronstad JW, Lodge JK, Heitman J, Davis RW, Fraser CM, Hyman RW. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*. 2005 Feb 25;307(5713):1321-1324.

Lopes MB, Rainieri S, Henschke PA, Langridge P. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999; 49:915-924.

Madrenys N, De Vroey C, Raes-Wuytack C & Torres-Rodrigues JM. Identification of the perfect state of *Cryptococcus neoformans* from 195 clinical isolates including 84 from AIDS patients. *Mycopathologia* 1993; 123: 65-68.

Martins LMS. Epidemiologia da criptococose em crianças e diversidade do *C. neoformans* no meio-norte do Brasil. Tese de Mestrado, 2003. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC – FIOCRUZ.

Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, Melhem Mde S, Medes-Giannini MJ. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(1):41-47.

Mayanja-Kizza H, Oishi K, Mitarai S, Yamashita H, Nalongo K, Watanabe K, Izumi T, Ococi-Jungala, Augustine K, Mugerwa R, Nagatake T, Matsumoto K. Combination therapy with fluconazole and flucytosine for cryptococcal meningitis in Ugandan patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 41:1835-1836.

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Disease*. 2003; 9:189-195.

Meyer W, Marszewske K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroon-greung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus 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*. 1999; 20:1790-1799.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):515-548.

Moore TD, Edman JC. The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Mol Cell Biol*. 1993;13(3):1962-1970.

Morera-López Y, Torres-Rodríguez JM, Jiménez-Cabello T, Baró-Tomás T. *Cryptococcus gattii*: in vitro susceptibility to the new antifungal albaconazole versus fluconazole and voriconazole. *Med Mycol*. 2005;43(6):505-510.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.

Netto ICO, Machado CC, Wagner MB & Severo LC. Meio século de criptococose no Brasil: revisão de 308 casos (1941-1992). *Infectologia* 1993; 7:5-14.

Newcombe G, Stirling B, McDonald S, Bradshaw Jr HD. *Melampsora* x *Columbiana*, a natural hybrid of *M. Medusae* and *M. occidentalis*. *Mycol Res.* 2000; 104:261-274.

Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, Landegren U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science.* 1994;265(5181):2085-2088.

Nishikawa MM, Lazéra MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL, Bezerra CCF, Pérez MA, Cardarelli P, Wanke B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from Clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol.* 2003, 41: 73-77.

Nurnburg P, Roewer L, Neitzel H, Sperling K, Popperl A, Hundrieser J, Poche H, Epplen C, Zischler H, Epplen JT. DNA fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)₅ / (GTG)₅: Somatic stability and germline mutations. *Hum Genet.* 1989;84:75:78.

Olson A, Stenlid J. Pathogenic fungal species hybrids infecting plants. *Microbes Infect.* 2002;4(13):1353-1359.

Pappalardo MC, Melhem MS. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45(6):299-305.

Passoni, LFC; Wanke, B; Nishikawa, MM & Lazéra, MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 1998; 36(5):305-311.

Perfect JR, Ketabchi N, Cox GM, Ingram CW, Beiser CL. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol.* 1993;31(12):3305-3309.

Perfect JR, Magee BB, Magee PT. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. *Infect Immun.* 1989;57(9):2624-2627.

Pfeiffer TJ, Ellis D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:407-408.

Raso TF, Werther K, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol.* 2004;42(4):355-362.

Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6:367-381.

Richardson MD & Warnock DW. Cryptococcosis, p. 149-159. *In: Fungal infection. Diagnosis and management.* Blackwell Science, Oxford. 1997.

- Rivera J, Feldmesser M, Cammer M, Casadevall A. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. *Infect Immun.* 1998;66(10):5027-5030.
- Rodrigues ML, Shi L, Barreto-Bergter E, Nimrichter L, Farias SE, Rodrigues EG, Travassos LR, Nosanchuk JD. Monoclonal Antibody to Fungal Glucosylceramide Protects Mice against Lethal *Cryptococcus neoformans* Infection. *Clin Vac Immunol.* 2007;14:1372–1376.
- Rozenbaum R, Gonçalves AJR, Wanke B et al. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathologia* 1992; 119:133-136
- Santos LO. Criptococose no estado do Amazonas: um estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical / FTM / IMTM (1988-1998). Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Tese de Mestrado, 2000.
- Schmeding KA, Jong SC, Hugh R. Sexual compatibility between serotypes of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). *Curr. Microbiol.* 1981;5:133-138.
- Smit EJ, Kock JL, van der Westhuizen JP, Britz TJ. Taxonomic relationships of *Cryptococcus* and *Tremella* based on fatty acid composition and other phenotypic characters. *J Gen Microbiol.* 1988;134(10):2849-2855.
- Soll DR. The ins and outs of DNA Fingerprinting the infectious fungi. *Clin. Microbiol. Reviews.* 2000, 13:332-370.
- Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infection.* 2003; 5:667-675.
- Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J.* 2002;43(10):792-4.
- Stevens DA, Kullberg BJ, Brummer E, Casadevall A, Netea MG, Sugar AM. Combined treatment: antifungal drugs with antibodies, cytokines or drugs. *Med. Mycol.* 2000; 38 Suppl.1:305-315.
- Swine D, Taelman H, Batungwanayo J, Bigirankana A, Bogaerts J. Contribution a l'étude de l'écologie de *Cryptococcus neoformans* en Afrique Centrale. *Méd Trop.* 1994; 54:53-55.
- Takeo K, Uesaka I, Uehira K, Nishiura M. Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vivo as observed by freeze-etching. *J Bacteriol.* 1973 Mar;113(3):1449-1454.
- Tanaka R, Nishimura K, Imanishi Y, Takahashi I, Hata Y, Miyaji M. Analysis of serotype AD strains from F1 progenies between urease-positive- and negative-strains of *Cryptococcus neoformans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2003;44:293-7
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. 2000; *Fungal Genet Biol.* 2000; 31(1):21-32.
- Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 1994; 140:19-26.

- Trilles L, Lazéra M, Wanke B, Theelen B, Boekhout T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med. Mycol.* 2003, **41**:383-390.
- Trilles L. Tipagem molecular de cepas brasileiras de *Cryptococcus neoformans*. Tese Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. 2000.
- Tscharke RL, Lazéra M, Chang YC, Wickes BL, Kwon-Chung, KJ. Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type α -specific. *Fungal gen. Biol.* 2003, **39**:230-237.
- van Duin D, Casadeval A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46:3394-3400.
- Vartivarian SE, Anaissie EJ, Cowart RE, Sprigg HA, Tingler MJ, Jacobson ES. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis.* 1993;167(1):186-90.
- Vecchiarelli A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 2000; 38:407-417.
- Vilcins I, Krockenberger M, Agus H, Carter D. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. *Med Mycol.* 2002;40(1):53-60.
- Waterman SR, Hacham M, Panepinto J, Hu G, Shin S, Williamson PR. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. *Infect Immun.* 2007;75(2):714-722.
- Weising K, Atkinson RG, Gardner RC. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Methods Appl.* 1995;4(5):249-255.
- White MH & Armstrong D. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 1994;8(2):383-398.
- WHO, 1986. Deuxieme reunion des Centres Collaborateurs del'OMS pour le SIDA: memorandum d'une reunion de l'OMS. *Bull World Health Organ* 64: 221-231.
- Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *C. neoformans* association with the alpha-mating type. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; **93**:7327-7331.
- Wickes BL, Moore TD, Kwon-Chung KJ. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 1994;140:543-550.
- Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a laccase. *J Bacteriol* 1994; **176**:656-664.

Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Ecol*. 2000;9(10):1471-1481.

Yee-Chun C, Shan-Chwen C, Chiang-Ching S, Chien-Ching H, L. Kwen-Tay, P. Yueh-Shya, and H. Wei-Chuan. Clinical features and *in vitro* susceptibilities of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; 36:175–183.

Zimmer BL, Hempel HO, Goodman NL. Pathogenicity of the basidiospores of *Filobasidiella neoformans*. *Mycopathologia*. 1984;85(3):149-153.