

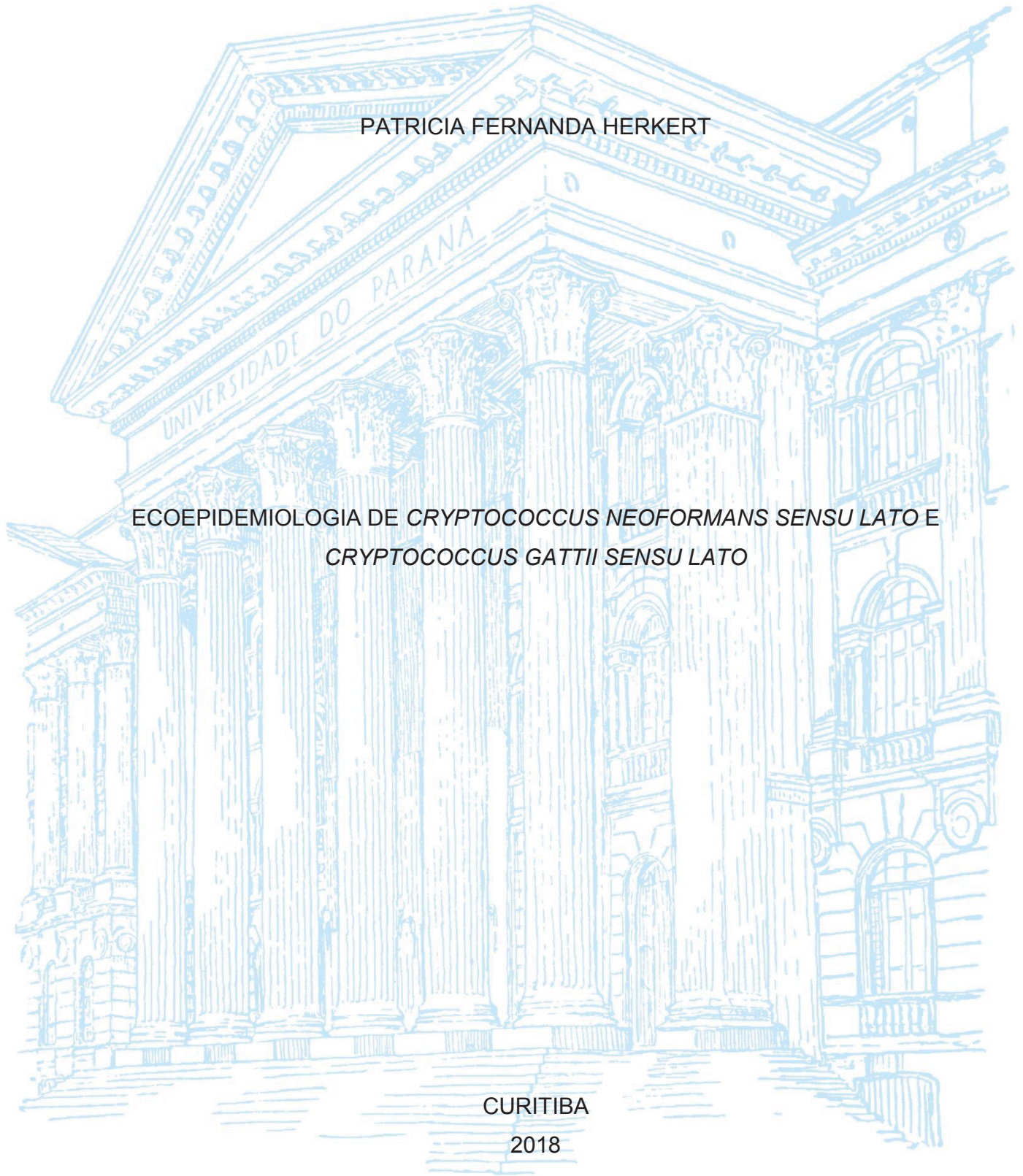
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA FERNANDA HERKERT

ECOEPIDEMIOLOGIA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS SENSU LATO* E
CRYPTOCOCCUS GATTII SENSU LATO

CURITIBA

2018



PATRICIA FERNANDA HERKERT

ECOEPIDEMIOLOGIA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS SENSU LATO* E
CRYPTOCOCCUS GATTII SENSU LATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles Filho
Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas –CRB/9-939)

Herkert, Patricia Fernanda

Ecoepidemiologia de *Cryptococcus neoformans sensu lato* e
Cryptococcus gattii sensu lato. / Patricia Fernanda Herkert. – Curitiba, 2018.
130 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Flávio de Queiroz-Telles Filho

Coorientadora: Vânia Aparecida Vicente

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. *Cryptococcus gattii*. 3. Criptococose. 4.
Epidemiologia I. Título II. Queiroz-Telles Filho, Flávio de. III. Vicente, Vânia
Aparecida. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

CDD (20. ed.) 576



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“Ecoepidemiologia de *Cryptococcus neoformans sensu lato* e
Cryptococcus gattii sensu lato”**

por

Patricia Fernanda Herkert

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles Filho (Presidente)

Profa. Dra. Marisol Dominguez Muro

Dr. Sérgio Monteiro de Almeida

Prof. Dr. Gil Benard

Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem

Curitiba, 25 de maio de 2018.

Dedico este trabalho e todas as minhas conquistas às pessoas mais incríveis que tenho em minha vida, meus pais Nelci e Hilário Herkert, que a cada dia me ensinam a ser uma pessoa melhor e não desistir dos meus objetivos e sonhos. Amo vocês e muito obrigada por estarem ao meu lado nesta caminhada.

AGRADECIMENTO

À DEUS,
por me amparar, dar força, sabedoria, luz e coragem para vencer cada dia.

Aos meus PAIS,
por sempre apoiarem minhas escolhas e permitirem que eu siga meu caminho.

Aos meus irmãos,
JANDREI e PEDRO, que me incentivam a estudar e conquistar meu espaço no mundo.

Ao meu amor ANDERSON,
por não me deixar desistir diante das dificuldades e apoiar meu crescimento.

Aos meus AMIGOS
pelo apoio e carinho quando preciso de cuidado.

Aos meus COLEGAS
pelos ensinamentos diários e por estarem sempre prontos para ajudar. Sem vocês meus queridos, eu tenho certeza que metade desta tese não seria concluída.

Ao queridos JACQUES F. MEIS e FERRY HAGEN
pela paciência e carinho com que receberam uma menina brasileira sem muita experiência, e também por dividirem comigo um pouco do conhecimento científico que têm. À vocês sempre serei muito grata!

Ao LABORATÓRIO DE MICOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR
Pelos isolados de *Cryptococcus* sp. cedidos para o estudo, além de todo o apoio técnico-científico durante os quatro anos de doutorado. Agradeço pelos ensinamentos diários e pela amizade de todos.

Aos meus orientadores
Dr. FLÁVIO QUEIROZ TELLES e Dra. VÂNIA A. VICENTE por aceitarem me orientar no doutorado e dividirem esta conquista comigo. Espero que possamos continuar trabalhando juntos.

À CAPES, CNPq, CWZ e RADBOUDUMC
por financiarem a pesquisa e minha estadia em Curitiba e em Nijmegen.

Muito obrigada à todos vocês por fazerem parte deste sonho!

“Ich habe keine besondere Begabung, sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.”

“Eu não tenho nenhum talento especial, mas sou apaixonadamente curioso.”

Albert Einstein

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por leveduras do gênero *Cryptococcus* spp., principalmente pelas espécies pertencentes aos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*. Estas leveduras estão presentes em diversos nichos ambientais, entre os quais destacam-se excretas de ave, madeira em decomposição, casca de árvore, solo, água e ar, com distribuição ambiental variável dependente de clima, vegetação e região geográfica. O presente trabalho teve como objetivo principal investigar as relações epidemiológicas e filogenéticas entre isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans sensu lato* e *C. gattii sensu lato*. Utilizou-se as técnicas de sedimentação e “swab” para o isolamento ambiental de *Cryptococcus* spp. em Curitiba-PR e o sequenciamento das regiões ITS para a identificação das espécies isoladas. Neste estudo obteve-se 19 isolados ambientais de *Cryptococcus* spp., sendo eles *C. laurentii* ($n=17$), *C. terrestris* ($n=1$) e *C. albidus* ($n=1$). Os nichos positivos para *Cryptococcus* spp. foram estruturas de madeira presentes nos parques da cidade, como brinquedos, bancos, floreiras e cercados, excretas de aves, madeira em decomposição, solo e casca de árvores dos gêneros *Acer* sp., *Anadenanthera* sp., *Tipuana* sp., *Schinus* sp. e *Ficus* sp.. A caracterização molecular de isolados clínicos de *C. gattii sensu lato* foi realizada através do “mating-type”, AFLP e sequenciamento multi-locus. Além disso, a suscetibilidade à anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol e flucitosina foi investigada através de microdiluição, seguindo o protocolo estabelecido pelo CLSI. Observou-se que todos os isolados estudados pertencem a espécie *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII), um isolado (UFU986) apresentou-se geneticamente indistinguível da linhagem que causou surtos de criptococose no Canadá, 14 são “mating-type” α e 4 são “mating-type” a e observou-se também que 10 isolados apresentaram novo padrão de AFLP. Todos os isolados são tipo-selvagem quanto a suscetibilidade aos antifúngicos. Para analisar as relações filogenéticas, dos isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans sensu lato* realizou-se a caracterização molecular através do “mating-type”, AFLP e tipagem de microssatélite. Observou-se que todos os isolados estudados pertencem a espécie *C. neoformans sensu stricto*, “mating-type” α e sorotipo A. Nas análises de AFLP observou-se a divisão dos isolados em AFLP1/VNI ($n=172$; 78.5 %), AFLP1A/VNII ($n=19$; 8.7 %), AFLP1B/VNII ($n=4$; 1.8 %) e um novo padrão de AFLP nomeado como AFLP1C ($n=23$; 10.5 %). Pela análise de microssatélites, verificou-se a presença de 129 genótipos, destes, 93 são genótipos únicos, e a maioria dos isolados ficou agrupada em um único complexo de microssatélite. O índice de diversidade de Simpson para a população estudada foi $D=0.9856$ mostrando alta diversidade genética. Ainda, observou-se que isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans s.s.* estão geneticamente relacionados, e que os mesmos genótipos de microssatélites foram isolados de regiões geográficas diferentes e em períodos diferentes, sugerindo a constante permanência destes genótipos no meio ambiente. Todos os isolados foram tipo-selvagem quanto a suscetibilidade aos antifúngicos.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, criptococose, isolamento ambiental, microssatélite, AFLP, MLST.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by *Cryptococcus* spp., mainly by the species belonging to *C. neoformans* and *C. gattii* species complexes. These yeasts are present in several environmental niches, including bird excreta, decaying wood, bark, soil, water and air, with a variable environmental distribution dependent on climate, vegetation and geographic region. The present work had as main objective to investigate the epidemiological and phylogenetic relationships between clinical and environmental isolates of *C. neoformans sensu lato* and *C. gattii sensu lato*. Sedimentation and swab techniques were used for the environmental isolation of *Cryptococcus* spp. in Curitiba-PR and the sequencing of ITS regions were used to identify the isolated species. We obtained 19 environmental isolates of *Cryptococcus* spp., the most frequent species was *C. laurentii* (n=17), followed by *C. terrestris* (n=1) and *C. albidus* (n=1). Positive niches for *Cryptococcus* spp. were wood structures present in the city parks, such as kid's toys, benches, flowerpots and enclosures, bird excreta, decaying wood, soil and tree bark of the genus *Acer* sp., *Anadenanthera* sp., *Tipuana* sp., *Schinus* sp. and *Ficus* sp.. The molecular characterization of clinical isolates of *C. gattii sensu lato* was performed using the mating-type, AFLP and multi-locus sequencing. In addition, susceptibility to amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole and flucytosine was investigated by microdilution, following the protocol established by CLSI. It was observed that all the isolates studied belong to the species *C. deuterogattii* (AFLP6 / VGII), 1 isolate (UFU986) was genetically indistinguishable from the lineage that caused cryptococcosis outbreaks in Canada, 14 are mating-type α and 4 were mating-type a and 10 isolates were also found to have a new AFLP pattern. All isolates are wild-type for antifungal susceptibility. To analyze the phylogenetic relationships of the clinical and environmental isolates of *C. neoformans sensu lato*, the molecular characterization was performed through mating-type, AFLP and microsatellite typing. It was observed that all the isolates studied belong to the species *C. neoformans sensu stricto*, mating-type α and serotype A. In the AFLP analyzes the isolates were divided in AFLP1/NIV (n=172, 78.5%), AFLP1A/VNII (n=19, 8.7%), AFLP1B/VNII (n=4, 1.8%) and a new AFLP standard named AFLP1C (n=23, 10.5%). Microsatellite analysis showed the presence of 129 genotypes, which 93 were single genotypes, and most of the isolates were grouped in a single microsatellite complex. The diversity Simpson's index for the studied population was $D=0.9856$ showing high genetic diversity. Furthermore, it has been observed that environmental and clinical isolates of *C. neoformans s.s.* are genetically related, and that the same genomes of microsatellites were isolated from different geographic regions and at different periods, suggesting the constant permanence of these genotypes in the environment. All isolates were wild-type for antifungal susceptibility.

Key words: *Cryptococcus*, cryptococcosis, environmental isolation, microsatellite, AFLP, MLST.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

FIGURA 1 - A, B, C – oco de árvores; D – serrapilheira; E – madeira em decomposição; F, G – armazenamento do material para transporte.....38

CAPÍTULO III

FIGURA 1 – Análise filogenética de máxima verossimilhança com 1000 repetições de *bootstrap* dos isolados de *C. deuterogattii* utilizando tipagem multi-locus. *Cryptococcus gattii sensu stricto* (WM179), *C. bacillisporus* 466 (WM161), *C. tetragattii* (WM779) e *C. decagattii* (IHEM14941) foram utilizadas como grupo externo. Vermelho: isolados do presente estudo; laranja: outros isolados brasileiros; azul: isolados da América Latina; preto: isolados de outros países; *: linhagens de referência.....51

FIGURA 2 – Padrões de AFLP apresentados pelos 18 isolados de *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII). WM178REF (*C. deuterogattii* AFLP6/VGII) foi utilizado como linhagem de referência na análise.....64

CAPÍTULO IV

FIGURA 1 – Padrões de AFLP dos 219 isolados de *Cryptococcus neoformans* s.s.. Verde: AFLP1/VNI; amarelo: AFLP1C/VNI; azul escuro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo A; azul claro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo B; vermelho: AFLP1B/VNII; preto: perfil não atribuído.....84

FIGURA 2 – Distribuição de genótipos de microssatélites de acordo com a fonte de isolamento de *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans* s.s.. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreado cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo ao outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha sólida e cinza: 2-3 loci; linha pontilhada: 4 ou mais loci.....88

FIGURA 3 – Distribuição de genótipos de microssatélites de *Cryptococcus neoformans sensu stricto* de acordo com os fatores de risco/doença subjacente do paciente. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans* s.s.. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreado cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo ao outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha sólida e cinza: 2-3 loci; linha pontilhada: 4 ou mais loci.....89

FIGURA 4 – Distribuição de genótipos de microssatélites de *Cryptococcus neoformans sensu stricto* combinado com o genótipo de AFLP. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans s.s.*. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreamento cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo ao outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha sólida e cinza: 2-3 loci; linha pontilhada: 4 ou mais loci.....90

FIGURA 5 – Distribuição de genótipos de microssatélites de acordo com o ano de isolamento de *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans s.s.*. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreamento cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo ao outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha sólida e cinza: 2-3 loci; linha pontilhada: 4 ou mais loci.....91

FIGURA 6 – Distribuição de genótipos de microssatélites de acordo com a região de isolamento de *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans s.s.*. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreamento cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo ao outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha sólida e cinza: 2-3 loci; linha pontilhada: 4 ou mais loci.....92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1 – Informações sobre os isolados de *Cryptococcus* spp. obtidos no isolamento ambiental.....44

CAPÍTULO III

TABELA 1 – Valores epidemiológicos de corte para definição de *Cryptococcus deuterogattii sensu lato* (AFLP1/VNI) tipo-selvagem.....56

TABELA 2 – Concentrações inibitórias mínimas de todos os isolados clínicos de *Cryptococcus deuterogattii* estudados.....61

TABELA 3 – Informações clínicas dos pacientes cujos isolados de *Cryptococcus deuterogattii* foram obtidos.....62

CAPÍTULO IV

TABELA 1 – Valores epidemiológicos de corte para definição de *Cryptococcus neoformans sensu stricto* (AFLP1/VNI) tipo-selvagem.....78

TABELA 2 - Concentração inibitória mínima dos antifúngicos frente aos isolados de *Cryptococcus neoformans sensu stricto* testados.....93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP – “Amplified Fragment Length Polymorphism”

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – “Clinical and Laboratory Standard Institute”

DNA – “Desoxiribonucleic acid”

DOPA – 3,4-di-hidroxifenilalanina

ECV – “Epidemiological Cutt-Off”

et al. – Colaboradores

GXM – glicuronoxylomanana

HIV – “Human Immunodeficiency Vírus”

ITS – Internal Transcribed Spacer

MAT – “Mating-type”

MLST – Sequenciamento multi-locus

s.l. – sensu lato

SNC – Sistema Nervoso Central

s.s. – sensu stricto

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	16
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 HIPÓTESES	18
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	19
1.3 REVISÃO DE LITERATURA	19
1.3.1 Ciclo de vida	19
1.3.2 Taxonomia do gênero <i>Cryptococcus</i>	20
1.3.3 Fatores de virulência	21
1.3.4 Suscetibilidade aos antifúngicos	22
1.3.5 Isolamento ambiental de <i>Cryptococcus</i> spp.	24
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO II – ISOLAMENTO AMBIENTAL DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP. EM CURITIBA-PR	35
1. RESUMO	36
2. INTRODUÇÃO	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 COLETA AMBIENTAL	37
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	39
3.3.1 Identificação micromorfológica	39
3.3.2 Identificação bioquímica	39
3.3.3 Identificação molecular	40
4. RESULTADOS	40
5. DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS “IN VITRO” DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>CRYPTOCOCCUS DEUTEROGATTII</i>	50
1. RESUMO	51
2. INTRODUÇÃO	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 ISOLADOS E INFORMAÇÕES CLÍNICAS	53
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	53
3.2.1 Extração do DNA genômico	53
3.2.2 Determinação do <i>mating-type</i>	53
3.2.3 Genotipagem AFLP	54
3.2.4 Sequenciamento multi-locus	54
3.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS	55
4. RESULTADOS	56
4.1 <i>MATING-TYPE</i> , GENÓTIPO E DIVERSIDADE GENÉTICA	56
4.2 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	57

4.3 INFORMAÇÕES CLÍNICAS	57
5. DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO IV – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS “IN VITRO” DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS SENSU STRICTO</i>	72
1. RESUMO	73
2. INTRODUÇÃO	73
3. MATERIAL E MÉTODOS	75
3.1 ISOLADOS E DADOS CLÍNICOS	75
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	76
3.2.1 Extração de DNA genômico	76
3.2.2 <i>Mating-type</i> , sorotipagem e genotipagem	76
3.2.3 Tipagem de microssatélite	77
3.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS “IN VITRO”	77
3.4 ANÁLISE DOS DADOS	78
4. RESULTADOS	78
4.1 DADOS CLÍNICOS	78
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	79
4.3 TIPAGEM DE MICROSSATÉLITE E DIVERSIDADE GENÉTICA	79
4.5 SUSCETIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS	80
5. DISCUSSÃO	80
REFERÊNCIAS	94
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
1. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
REFERÊNCIAS	105
CAPÍTULO VI – LISTA DE PUBLICAÇÕES	108
1. LISTA DE PUBLICAÇÕES	109
LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS	111

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

A criptococose é uma infecção sistêmica causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus* spp., cuja infecção é adquirida pela inalação de propágulos fúngicos sexuados (basidiósporos) presentes no meio ambiente (VELAGAPUDI et al., 2009). As manifestações clínicas observadas podem variar desde colonização pulmonar assintomática, até pneumonia, meningoencefalite ou disseminação para qualquer órgão ou tecido (VELAGAPUDI et al., 2009). A meningoencefalite é a principal manifestação clínica e apresenta evolução grave e frequentemente fatal (NEGRONI, 2012), que mesmo nos casos de cura pode deixar sequelas neurológicas como cegueira, surdez, fraqueza muscular e disfagia (CHEN et al., 2012). Além de atingir o sistema nervoso central (SNC) e o pulmão, ainda pode ser observado o acometimento de pele, tecidos moles e tecido osteoarticular (HUSAIN; WAGENER; SINGH, 2001; SINGH et al., 2007).

As leveduras do gênero *Cryptococcus* estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em solo, excretas de aves, poeira, folhas e madeira em decomposição (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007). As espécies dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* são importantes na micologia médica por estarem envolvidas com infecções em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes. Ainda assim, as espécies *C. laurentii* (agora classificado como *Papilliotrema laurentii*), *C. albidus*, *C. curvatus*, *C. adeliensis* podem ser encontradas como causadoras de infecções em humanos (BICANIC; HARRISON, 2005; LEVITZ; BOEKHOUT, 2006).

O complexo de espécies *C. neoformans* é cosmopolita e está envolvido com a maioria dos episódios de criptococose no mundo, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos, como aqueles que fazem uso de corticosteróides, que receberam transplante de órgãos ou que apresentam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (ANTACHOPOULOS & WALSH, 2012). A principal manifestação clínica é a meningoencefalite (BICANIC & HARRISON, 2005), com registro de aproximadamente 223 mil novos casos entre os pacientes infectados pelo vírus HIV em 2014 em todo o mundo, resultando em aproximadamente 180 mil mortes (RAJASINGHAM et al., 2017).

A criptococose por espécies do complexo *C. gattii* é uma doença emergente e em expansão quanto à sua distribuição geográfica. Estas espécies são encontradas

principalmente em regiões tropicais e subtropicais, entretanto adaptaram-se recentemente a regiões de clima frio ou temperado, como Columbia Britânica no Canadá e nos estados de Washington e Oregon no noroeste dos Estados Unidos, onde ocorreram surtos de criptococose causados por *C. deuterogattii* (VGIIa/AFLP6A) (KIDD et al., 2004; DATTA et al., 2009; GALANIS & MACDOUGALL, 2010; HAGEN et al., 2010). A criptococose causada por este complexo ocorre principalmente em indivíduos sem imunossupressão aparente, acometendo pulmões e sistema nervoso central (SNC) simultaneamente (DEBOURGOGNE et al., 2012). Ainda, podem ser observadas lesões cutâneas, formação de criptococomas e sequelas neurológicas (BYRNES et al., 2011; CHEN et al., 2012; MARQUES et al., 2012; CICORA et al., 2015; FRANCO-PAREDES et al., 2015).

O mecanismo de dispersão deste fungo não está totalmente compreendido, porém, acredita-se que a distribuição de subprodutos de madeira, translocação do fungo através do ar, correntes de água e por agentes bióticos (migração de animais, pássaros e insetos) e abióticos (veículos de transporte e sapatos), podem ser os principais fatores associados a disseminação de *Cryptococcus* spp. pelo ambiente (KIDD, et al., 2007; CHATURVEDI & CHATURVEDI, 2011).

1.1 HIPÓTESES

- Isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans s.l.* e *C. gattii s.l.* estão relacionados geneticamente.
- Isolados ambientais de *C. neoformans s.l.* e *C. gattii s.l.* dividem o mesmo nicho ambiental.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Compreender a epidemiologia molecular e as relações filogenéticas entre isolados clínicos e ambientais de espécies dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar as diferentes fontes ambientais de *Cryptococcus* spp. em Curitiba-PR;
- Realizar a caracterização molecular de isolados de *Cryptococcus* spp. de origem ambiental e clínica depositados na micoteca do Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas/UFPR;
- Comparar a diversidade genética entre os isolados clínicos e ambientais e suas relações evolutivas geográficas e temporais;
- Verificar a suscetibilidade “in vitro” dos isolados de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos utilizados para o tratamento da criptococose.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Ciclo de vida

A reprodução de *C. neoformans* e *C. gattii* ocorre de forma assexuada, por brotamento único ou múltiplo. Grande parte dos isolados clínicos e ambientais apresentam-se na forma anamórfica haplóide. Mas, também pode se reproduzir sexuadamente na forma teleomórfica, onde passa a ser denominado como *Filobasidiella neoformans* (*C. neoformans*) e *Filobasidiella bacillispora* (*C. gattii*) (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

Possui um sistema “Mating Type” (MAT) de reprodução sexuada apresentando dois tipos celulares, **a** e α . O locus de MAT é responsável pelo ciclo de vida sexuado e codifica genes para a produção e detecção de feromônio. A célula MAT**a** produz feromônio MF**a** que é detectado pela célula MAT α , esta responde ao estímulo produzindo um tubo de conjugação, e MAT α produz o feromônio MF α que é detectado pela célula MAT**a** que responde ao estímulo aumentando o volume celular. Durante a esporulação forma-se um basídio na extremidade da hifa, onde os núcleos MAT**a** e MAT α se fundem e sofrem repetidas meioses, formando cadeias de esporos que emergem do basídio. Os esporos são dispersos no ambiente e germinam em células de leveduras haplóides (BOVERS et al., 2008; CHUN; MADHANI, 2010). Quando há ausência de células MAT**a**- α a reprodução pode ocorrer entre células de um mesmo tipo, por meio da auto filamentação (LIN, 2009).

A recombinação sexual pode levar a mudanças drásticas no genótipo e no fenótipo do microrganismo, podendo implicar diretamente na virulência, uma vez que as células filhas resultantes podem ser significativamente mais virulentas que as células ancestrais (VOELZ et al., 2013). Segundo Lin e colaboradores (2009) células que possuem o MATa estão relacionadas com baixa virulência no hospedeiro.

1.3.2 Taxonomia do gênero *Cryptococcus*

As leveduras do gênero *Cryptococcus* pertencem ao filo Basidiomycota, classe Tremellomycetes. Por ter origem polifilética, o gênero possui espécies agrupadas dentro das Ordens Tremellales, Trichosporonales e Filobasidiales (FELL et al., 2000; FINDLEY et al., 2009; LIU et al., 2015a; LIU et al., 2015b). Dentro do gênero *Cryptococcus* são classificadas mais de 70 espécies, destas, as espécies agrupadas nos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* são de interesse médico, pois são os principais agentes etiológicos da criptococose em humanos e animais (BYRNES et al., 2011; NASSER & VIEIRA, 2011; DEBOURGOGNE et al., 2012; PAPPAS, 2013; DANESE et al., 2014; KANO et al., 2015). A taxonomia do gênero foi revisada recentemente (LIU et al., 2015a; LIU et al., 2015b; HAGEN et al., 2015) sugerindo a consideração das duas variedades de *C. neoformans* como espécies diferentes: *C. neoformans* (*C. neoformans* var. *grubii* / genótipos AFLP1/VNI, AFLP1A/VNII e AFLP1B/VNII) e *C. deneoformans* (*C. neoformans* var. *neoformans* / genótipo AFLP2/VNIV) (HAGEN et al., 2015); e os cinco genótipos do complexo de espécies *C. gattii* como cinco espécies, *C. gattii sensu stricto* (AFLP4/VGI), *C. bacillisporus* (AFLP5/VGIII), *C. deutero-gattii* (AFLP6/VGII), *C. tetra-gattii* (AFLP7/VGIV) e *C. decagattii* (AFLP10/VGIV) (HAGEN et al., 2015)¹.

Embora a revisão taxonômica tenha sido estabelecida após 15 anos de debate, parte da comunidade científica prefere usar apenas o termo "complexo de

¹ As terminologias *sensu lato* e *sensu stricto* são utilizadas para referir espécies agrupadas dentro de um complexo de espécies. *Sensu lato* significa *amplo sentido*, enquanto que *sensu stricto* significa *sentido estrito*. Portanto, como exemplo, *Cryptococcus neoformans sensu lato* é usado quando todas as espécies dentro do complexo são consideradas. Assim, com a nomenclatura antiga isto compreende "*C. neoformans* variedade *grubii*" e "*C. neoformans* variedade *neoformans*", quando os isolados em questão não forem caracterizados. *Cryptococcus neoformans sensu stricto* está relacionado com a espécie *C. neoformans* agrupada dentro do complexo (por exemplo, a nomenclatura antiga de *C. neoformans* variedade *grubii*).

espécies" (KWON-CHUNG et al., 2017), para referenciar os genótipos/espécies pertencentes aos complexos apesar das evidências que suportam a revisão da taxonomia do gênero (HAGEN et al., 2017). No presente trabalho, a taxonomia sugerida por Hagen et al. (2015) (apresentada no parágrafo anterior) foi considerada para a citação das espécies dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*.

1.3.3 Fatores de virulência

As espécies dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de causar doença em indivíduos imunodeprimidos e imunocompetentes, para isto, devem evadir as defesas do hospedeiro. Os fatores responsáveis pela patogenicidade incluem as características do hospedeiro e a virulência do microrganismo, que juntos determinam a severidade da doença.

Para que seja capaz de invadir as barreiras existentes no sistema respiratório do hospedeiro e se instalar nos alvéolos pulmonares, o microrganismo deve produzir células infectantes de tamanho compatível com o diâmetro dos alvéolos. Portanto, basidiósporos ou células de leveduras desidratadas são morfologias compatíveis (1,8-3 μm) para esta invasão (LIN, 2009). Além disso, deve ser capaz de suportar temperatura de 37°C, concentração de gás carbônico de aproximadamente 5% e pH entre 7,3 e 7,4. Para que haja crescimento a estas condições, o fungo expressa calcineurina, uma fosfatase específica ativada por Ca^{2+} e calmodulina que está envolvida com a resposta ao estresse em leveduras (BUCHANAN; MURPHY, 1998; FERNANDES et al., 2016).

Cryptococcus spp. é o único fungo patogênico para seres humanos que possui uma cápsula polissacarídica externa, formada principalmente pela interação de dois polissacarídeos de alto peso molecular: glicuronoxylomanana (GXM) e galactoxylomanana. A capsula polissacarídica protege o fungo da fagocitose pelas células fagocíticas, bloqueia o reconhecimento dos antígenos de superfície pelas células apresentadoras de antígenos e compromete a maturação de células dendríticas resultando em fracas respostas pró-inflamatórias e de células-T (ARAÚJO et al., 2012; VECCHIARELLI et al., 2013; HUSTON et al., 2013; HUSTON et al., 2016).

A capacidade de formação de melanina pelo fungo confere proteção contra as reações oxidativas geradas pela radiação ultravioleta e pelas células de defesa do hospedeiro (REOLON; PEREZ; MEZZARI, 2004). Para produzi-la, este fungo realiza

a conversão de 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA) a dopaquinona pelas enzimas fenoloxidasas, pois necessita de substrato exógeno para sua síntese (EISENMAN; CASADEVALL, 2012). O cérebro é um tecido rico em DOPA, isto pode explicar a migração deste fungo para o sistema nervoso central (BUCHANAN; MURPHY, 1998). As células de *Cryptococcus* atravessam a barreira hematoencefálica no interior de células fagocíticas e através de movimentos como paracitose e transcitose, onde há a passagem do fungo entre as junções celulares e através das células do endotélio vascular cerebral, respectivamente (CHANG et al., 2004; VU et al., 2014).

Algumas enzimas produzidas por *Cryptococcus* são responsáveis por atuar como fatores de virulência. Entre elas, as proteases são importantes durante o processo de invasão tecidual e destruição de imunoglobulinas, e as fosfolipases que também participam do processo de invasão tecidual, por meio da destruição das membranas plasmáticas das células do hospedeiro (BUCHANAN & MURPHY, 1998).

Uma característica central da patogênese das infecções criptocócicas é a ocorrência de aglomerados fúngicos associados com grandes quantidades de GXM. Isto é coordenado pela comunicação célula-célula que melhora a sobrevivência do fungo no hospedeiro, regula a multiplicação celular e a expressão dos fatores de virulência (ALBUQUERQUE et al., 2013).

1.3.4 Suscetibilidade aos antifúngicos

Diferentes padrões de suscetibilidade à antifúngicos “in vitro” foram observados entre as espécies de *Cryptococcus* spp.. De maneira geral, espécies do complexo *C. gattii* apresentam concentrações inibitórias mínimas (CIM) mais elevadas para os antifúngicos azólicos que as espécies do complexo *C. neoformans* (ESPINEL-INGROFF et al., 2012; ESPINEL-INGROFF et al., 2015; GUTCH et al., 2015). Esse padrão também foi observado em isolados clínicos de Taiwan para os antifúngicos anfotericina B e flucitosina (CHEN et al., 2000). Em um estudo realizado no Brasil, isolados clínicos de *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII) apresentaram valores de CIM para flucitosina (TRILLES et al., 2012; FAVALESSA et al., 2014) e fluconazol maiores que isolados de *C. neoformans* s.s. (AFLP1/VNI) (TRILLES et al., 2012).

As diferentes espécies do complexo *C. gattii* também apresentam diferentes padrões de susceptibilidade à antifúngicos “in vitro”. *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) possui média geométrica de CIM superior para flucitosina, fluconazol,

voriconazol, itraconazol, posaconazol e isavuconazol quando comparado com a espécie *C. gattii* s.s. (AFLP4/VGI) (HAGEN et al., 2010; TRILLES et al., 2012). Em um estudo realizado por Lockhart e colaboradores (2012) observou-se que *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII) apresentou média geométrica de CIM mais alta para fluconazol, seguido de *C. bacillisporus* (AFLP5/VGIII), genótipo VGIV (AFLP não genotipado) e por último *C. gattii* s.s. (AFLP4 / VGI), que apresentou os menores valores entre as espécies do complexo (LOCKHART et al., 2012). Apesar dos diferentes padrões de susceptibilidade à antifúngicos que são observados “in vitro”, a terapia inicial para a criptococose é escolhida independentemente da espécie que está causando a infecção. As alterações no tratamento ocorrem de acordo com as manifestações clínicas apresentadas pelo paciente e seu estado imunológico (PERFECT et al., 2010).

Além da suscetibilidade, o fenômeno da heterossistência (capacidade de adaptação a altas concentrações de drogas) é observado para os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* quando testados com altas concentrações de itraconazol e fluconazol (SIONOV et al., 2009; VARMA & KWON-CHUNG, 2010). A heterossistência está relacionada com mudanças fenotípicas das células de *Cryptococcus* como, por exemplo, diminuição do tamanho da célula e da cápsula, diminuição da quantidade de ergosterol presente na parede celular, menor susceptibilidade ao estresse oxidativo e maior capacidade de proliferação no interior de macrófagos (VARMA & KWON-CHUNG, 2010). Estas características podem estar relacionadas com os casos de recaída durante a terapia de manutenção, porém a importância clínica do fenômeno não está elucidada (FALAGAS et al., 2008; SIONOV et al., 2009; VARMA & KWON-CHUNG, 2010).

Os testes de suscetibilidade à antifúngicos não são realizados rotineiramente nos laboratórios brasileiros (FAVALESSA et al., 2014). Estes testes tem aplicabilidade em casos de falência terapêutica ou em pacientes que apresentam recaídas frequentes e que foram tratados com anfotericina B ou azólicos. Poucos trabalhos na literatura correlacionam o desfecho clínico com a suscetibilidade aos antifúngicos (DANNAOUI et al., 2006), mas apesar da maioria dos isolados de *Cryptococcus* spp. ser tipo-selvagem aos antifúngicos poliênicos, flucitosina e azólicos (CALVO et al., 2001; FAVALESSA et al., 2014), o uso prolongado de fluconazol durante terapias de manutenção de meningite em pacientes com AIDS pode resultar na seleção de isolados não-selvagens para este antifúngico (FRIESE et al., 2001).

1.3.5 Isolamento ambiental de *Cryptococcus* spp.

Os nichos ambientais dos complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* têm sido amplamente investigados, revelando diversas fontes ambientais antes não consideradas como reservatórios para o fungo (HAGEN & BOEKHOUT, 2010; CHOWDHARY et al., 2012; COGLIATI et al., 2016; VÉLEZ & ESCANDÓN, 2017).

Cryptococcus neoformans s.s. (AFLP1/VNI) é a espécie de maior predominância em todo o mundo, sendo responsável pela maioria dos casos de criptococose (MEYER et al., 2003; COGLIATI et al., 2013). Já a espécie *C. deneoformans* (AFLP2/VNIV) ocorre com maior frequência na Europa e América do Norte (COGLIATI et al., 2013). O complexo de espécies *C. neoformans* tem sido isolado principalmente de excretas de pombos que são encontrados com facilidade no perímetro urbano (TAKAHARA et al., 2013; REOLON et al., 2004; FERREIRA et al., 2014; ELLABIB et al., 2016), e de aves passeriformes e psitacíformes que podem viver em ambiente doméstico (ABEGG et al., 2006). Além disso, muitas espécies de árvores foram relatadas na literatura como reservatório ambiental, são elas *Colophospermum mopane*, *Acacia* sp., *Ziziphus mucronata*, *Olea europaea*, *Cassia* sp., *Ficus* sp. e *Tipuana tipu* (RANDHAWA et al., 2008; GIRISH KUMAR et al., 2010; CHEN et al., 2015; GUTCH et al., 2015; KANGOGO et al., 2015; ELLABIB et al., 2016; VANHOVE et al., 2016).

Os primeiros isolamentos ambientais de *C. gattii* s.l. foram obtidos a partir de *E. camaldulensis* na Austrália, indicando uma associação específica entre *C. gattii* s.l. e *E. camaldulensis* nesta região. Segundo Ellis e Pfeiffer (1990) a dispersão de *C. gattii* s.l. parecia ocorrer no final da primavera, quando o período de florescimento de *E. camaldulensis* iniciava. Além disso, a distribuição de *E. camaldulensis* correspondia com a região de ocorrência de focos endêmicos de criptococose causada por *C. gattii* s.l. na Austrália (ELLIS & PFEIFFER, 1990). Em outras regiões do mundo, o isolamento de espécies do complexo *C. gattii* tem sido realizado a partir de uma grande variedade de árvores, como *Acacia xanthophloea*, *Ceratonia siliqua*, *Corymbia ficifolia*, *Moquilea tomentosa* e *Pseudotsuga menziesii* (ESCANDÓN & CASTAÑEDA, 2015; LINARES et al., 2015; KANGOGO et al., 2015; ALVES et al., 2016; COGLIATI et al., 2016). Contudo, outros nichos ambientais têm sido relatados na literatura, como por exemplo, poeira doméstica de casas de madeira positivas para

C. deuterogattii (BRITO-SANTOS et al., 2015) e excretas de aves positivas para *C. gattii* s.s. (ABBEG et al., 2006; KANGOGO et al., 2015).

Apesar de todos os estudos em *Cryptococcus* spp. e criptococose, muitos países desconhecem os próprios reservatórios ambientais do fungo e a diversidade de espécies a qual a população está exposta. O conhecimento da epidemiologia local é importante para conhecer possíveis fontes de contaminação para humanos, assim como, conhecer as espécies presentes no local para traçar as melhores medidas de prevenção e controle da criptococose.

REFERÊNCIAS

- ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a Southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v.161, p.83–91, 2006.
- ALBUQUERQUE, P.; NICOLA, A.M.; NIEVES, E.; PAES, H.C.; WILLIAMSON, P.R.; SILVA-PEREIRA, I.; CASADEVALL, A. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v.5, e00986-13, 2013.
- ALVES, G. S. B.; FREIRE, A. K. L.; BENTES, A. DOS S.; PINHEIRO, J. F. DE S.; DE SOUZA, J. V. B.; WANKE, B.; MATSUURA, T.; JACKISCH-MATSUURA, A. B. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v.59, p.509–515, 2016.
- ANTACHOPOULOS, C.; WALSH, T.J. Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p.126-133, 2012.
- ARAÚJO, G. S.; FONSECA, F. L.; PONTES, B.; TORRES, A.; CORDERO, R. J. B.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; CASADEVALL, A.; VIANA, N. B.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; GARCIA, E. S.; SOUZA, W.; FRASES, S. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS ONE**, v.7, e29561, 2012.
- BICANIC, T.; HARRISON, T.S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v.72, p.99–118, 2005.
- BRITO-SANTOS, F.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B.; MEYER, W.; MEYER, W.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LAZÉRA, M. DOS S. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. **PLoS ONE**, v.10, e0115866, 2015.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, p.S4-S12, 2008.
- BUCHANAN, K.L.; MURPHY, J.W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.73-83, 1998.
- BYRNES, E. J.; BARTLETT, K. H.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infection**, v.13, p.895–907, 2011.
- CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY,

- M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2348-2350, 2001.
- CHEN, SC-A.; SLAVIN, M. A.; HEATH, C. H.; PLAYFORD, E. G.; BYTH, K.; MARRIOTT, D.; KIDD, S. E.; BAK, N.; CURRIE, B.; HAJKOWICZ, K.; KORMAN, T. M.; MCBRIDE, W. J. H.; MEYER, W.; MURRAY, R.; SORRELL, T. C.; on behalf of the Australia and New Zealand Mycoses Interest Group (ANZMIG)-*Cryptococcus* Study. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clinical and Infectious Diseases**, v.55, p.789–798, 2012.
- CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, M. J.; MILLER, G. F.; PARE, D. R.; DAM, T.; PAUL-SATYASEE, M.; KIM, K. S.; KWON-CHUNG, K. J. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection & Immunity**, v.72, p.4985–4995, 2004.
- CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends in Microbiology**, v.19, p.564-71, 2011.
- CHEN, Y. C.; CHANG S. C.; SHIH, C. C.; HUNG, C. C.; LUHBD, K. T.; PAN, Y. S.; HSIEH, W. C. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.36, p.175-183, 2000.
- CHEN, S. C. A.; SLAVIN, M. A.; HEATH, C.H.; PLAYFORD, E. G.; BYTH, K.; MARRIOTT, D.; KIDD, S. E.; BAK, N.; CURRIE, B.; HAJKOWICZ, K.; KORMAN, T. M.; MCBRIDE, W. J.; MEYER, W.; MURRAY, R.; SORRELL, T. C; Australia and New Zealand Mycoses Interest Group (ANZMIG)-*Cryptococcus* Study. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* Infection: determinants of neurological sequelae and death. **CID**, v.55, n.6, p.789–798, 2012.
- CHEN, Y.; LITVINTSEVA, A. P.; FRAZZITTA, A. E.; HAVERKAMP, M. R.; WANG, L.; FANG, C.; MUTHOGA, C.; MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Comparative analyses of clinical and environmental populations of *Cryptococcus neoformans* in Botswana. **Molecular Ecology**, v.24, p.3559–3571, 2015.
- CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; PRAKASH, A.; MEIS, J. F. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: An update. **Critical Reviews in Microbiology**, v.38, p.1–16, 2012.
- CHUN, C.D.; MADHANI, H.D. Applying genetics and molecular biology to the study of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Methods Enzymology**, v.470, p.797–831, 2010.
- CICORA, F.; PETRONI, J.; FORMOSA, P.; ROBERTI, J. A rare case of *Cryptococcus gattii* pneumonia in a renal transplant patient. **Transplant Infectious Disease**, v.17, p.463–466, 2015.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, 675213 p.1–23, 2013.

COGLIATI, M.; D'AMICIS, R.; ZANI, A.; MONTAGNA, M. T.; CAGGIANO, G.; DE GIGLIO, O.; BALBINO, S.; DE DONNO, A.; SERIO, F.; SUSEVER, S.; ERGIN, C.; VELEGRAKI, A.; ELLABIB, M. S.; NARDONI, S.; MACCI, C.; OLIVERI, S.; TROVATO, L.; DIPINETO, L.; RICKERTS, V.; MCCORMICK-SMITH, I.; AKCAGLAR, S.; TORE, O.; MLINARIC-MISSONI, E.; BERTOUT, S.; MALLIÉ, M.; MARTINS, M. DA L.; VENCÀ, A. C. F.; VIEIRA, M. L.; SAMPAIO, A. C.; PEREIRA, C.; GRISEO, G.; ROMEO, O.; RANQUE, S.; AL-YASIRI, M. H. Y.; KAYA, M.; CERIKCIOGLU, N.; MARCHESE, A.; VEZZULLI, L.; ILKIT, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; PASQUALE, V.; KOREM, M.; POLACHEK, I.; SCOPA, A.; MEYER, W.; FERREIRA-PAIM, K.; HAGEN, F.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; LOCKHART, S. R.; TINTELNOT, K.; TORTORANO, A. M.; DROMER, F.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J.; INÁCIO, J.; ALONSO, B.; COLOM, M. F. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. **FEMS Yeast Research**, v.16, fow045, 2016.

DANNAOUI, E.; ABDUL, M.; ARPIN, M.; MICHEL-NGUYEN, A.; PIENS, M.A.; 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.2464-2470, 2006.

DANESI, P.; FIRACATIVE, C.; COGLIATI, M.; OTRANTO, D.; CAPELLI, G.; MEYER, W. Multilocus sequence typing (MLST) and M13 PCR fingerprinting revealed heterogeneity amongst *Cryptococcus* species obtained from Italian veterinary isolates. **FEMS Yeast Research**, v.14, p.897-909, 2014.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; BAER, R.; BYRNES, E.; GALANIS, E.; HEITMAN, J.; HOANG, L.; LESLIE, M. J.; MACDOUGALL, L.; MAGILL, S. S.; MORSHED, M. G.; MARR, K. A.; *Cryptococcus gattii* working group of the Pacific Northwest. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.8, p.1185-1191, 2009.

DEBOURGOGNE, A.; HAGEN, F.; ELENGA, N.; LONG, L.; BLANCHET, D.; VERON, V.; LORTHOLARY, O.; CARME, B.; AZNAR, C. Successful treatment of *Cryptococcus gattii* neurocryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent child from the French Guiana Amazon region. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.210–213, 2012.

EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.93, p.931–940, 2012.

ELLABIB, M. S.; ABOSHKIWA, M. A.; HUSIEN, W. M.; D'AMICIS, R.; COGLIATI, M. Isolation, identification and molecular typing of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. **Mycopathologia**, v.181, p.603-608, 2016.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.1642–1644, 1990.

ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. Long-term survival of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in stored environmental samples from Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p.197–199, 2015.

ESPINEL-INGROFF, A.; ALLER, A. I.; CANTON, E.; CASTANON-OLIVARES, L. R.; CHOWDHARY, A.; CORDOBA, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GOVENDER, N.; HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; JOHNSON, E.; KIDD, S.; LASS-FLORL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; ST-GERMAIN, G.; TRILLES, L.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.5898–5906, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; GONZALEZ, G. M.; GUINEA, J.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; THOMPSON, G. R.; TURNIDGE, J. Multicenter study of isavuconazole MIC distributions and epidemiological cutoff values for the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex using the CLSI M27-A3 broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, p.666–668, 2015.

FAVALESSA, O. C.; DE PAULA, D. A. J.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; TADANO, T.; LAZERA, M. DOS S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; WALDEREZ SZESZS, M.; SILVA, D.; HAHN, R. C. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, p.1037-1043, 2014.

FALAGAS, M. E.; MAKRIS, G. C.; DIMOPOULOS, G.; MATTHAIIOU, D. K. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.101–104, 2008.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.3, p.1351–1371, 2000.

FERNANDES, K. E.; DWYER, C.; CAMPBELL, L. T.; CARTER, D. A. Species in the *Cryptococcus gattii* complex differ in capsule and cell size following growth under capsule-inducing conditions. **mSphere**, v.1, e00350-16, 2016.

FERREIRA, A. S.; SAMPAIO, A.; MADURO, A. P.; SILVA, I.; TELES, F.; MARTINS, M. L.; INÁCIO, J. Genotypic diversity of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Northern Portugal. **Mycoses**, v.57, p.98–104, 2014.

FINDLEY, K.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; METIN, B.; KROISS, J.; FONSECA, A.; VILGALYS, R.; HEITMAN, J. Phylogeny and phenotypic characterization of

pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukaryotic Cell**, v.8, p.353–361, 2009.

FRANCO-PAREDES, C.; WOMACK, T.; BOHLMAYER, T.; SELLERS, B.; HAYS, A.; PATEL, K.; LIZARAZO, J.; LOCKHART, S. R.; SIDDIQUI, W.; MARR, K. A. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **Lancet Infectious Diseases**, v.15, p.348–355, 2015.

FRIESE, G.; DISCHER, T.; FUSSIE, R.; SCHMALRECK, A.; LOHMEYER, J. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS-associated cryptococcal disease. **AIDS**, v.17, p.2344-2345, 2001.

GALANIS, E.; MACDOUGALL, L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.251-257, 2010.

GIRISH KUMAR, C. P.; PRABU, D.; MITANI, H.; MIKAMI, Y.; MENON, T. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. **Mycoses**, v.53, p.262–264. 2010.

GUTCH, R. S.; NAWANGE, S. R.; SINGH, S. M.; YADU, R.; TIWARI, A.; GUMASTA, R.; KAVISHWAR, A. Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, p.1125–1133, 2015.

HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M.-T.; BARTLETT, K. H.; SWINNE, D.; GEERTSEN, E.; KLAASSEN, C. H. W.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.5139–5145, 2010.

HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. **Mycopathologia**, v.170, p.209–211, 2010.

HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B.; KOLECKA, A.; POLACHECK, I.; SIONOV, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; LUMBSCH, H. T.; BOEKHOUT, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetic Biology**, v.78, p.16–48. 2015.

HAGEN, F.; LUMBSCH, H. T.; ARSIC ARSENIJEVIC, V.; BADALI, H.; BERTOUT, S.; BILLMYRE, R. B.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J.; CARBIA, M.; CHAKRABARTI, A.; CHATURVEDI, S.; CHATURVEDI, V.; CHEN, M.; CHOWDHARY, A.; COLOM, M-F.; CORNELLY, O. A.; CROUS, P. W.; CUÉTARA, M. S.; DIAZ, M. R.; ESPINEL-INGROFF, A.; FAKHIM, H.; FALK, R.; FANG, W.; HERKERT, P. F.; FERRER RODRÍGUEZ, C.; FRASER, J. A.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; IDNURM, A.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M-T.; KHAN, Z.; KHAYHAN, K.; KOLECKA, A.; KURTZMAN, C. P.; LAGROU, K.; LIAO, W.; LINARES, C.; MEIS, J. F.; NIELSEN, K.; NYAZIKA, T. K.; PAN, W.; PEKMEZOVIC, M.; POLACHECK, I.; POSTERARO,

B.; DE QUEIROZ TELLES, F.; ROMEO, O.; SÁNCHEZ, M.; SAMPAIO, A.; SANGUINETTI, M.; SRIBUREE, P.; SUGITA, T.; TAJ-ALDEEN, S. J.; TAKASHIMA, M.; TAYLOR, J. W.; THEELEN, B.; TOMAZIN, R.; VERWEIJ, P. E.; WAHYUNINGSIH, R.; WANG, P.; BOEKHOUT, T. Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* Genus. **mSphere**, v.2, e00238-17, 2017.

HUSAIN, S.; WAGENER, M.M.; SINGH, N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, p.375-381, 2001.

HUSTON, S. M.; LI, S. S.; STACK, D.; TIMM-MCCANN, M.; JONES, G. J.; ISLAM, A.; BERENGER, B. M.; XIANG, R. F.; COLARUSSO, P.; MODY, C. H. *Cryptococcus gattii* is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. **Journal of Immunology**, v.191, p.249–261, 2013.

HUSTON, S. M.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; XIANG, R. F.; OGBOMO, H.; STACK, D.; LI, S. S.; TIMM-MCCANN, M.; KYEI, S. K.; OYKHMANN, P.; KWON-CHUNG, K.; MODY, C. H. *Cryptococcus gattii* capsule blocks surface recognition required for dendritic cell maturation independent of internalization and antigen processing. **Journal of Immunology**, v.196, p.1259–1271, 2016.

KANGOGO, M.; BADER, O.; BOGA, H.; WANYOIKE, W.; FOLBA, C.; WORASILCHAI, N.; WEIG, M.; GROß, U.; BIL, C. C. Molecular types of *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex from clinical and environmental sources in Nairobi, Kenya. **Mycoses**, v.58, p.665–670, 2015.

KANO, R.; OKUBO, M.; YANAI, T.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. First isolation of azole-resistant *Cryptococcus neoformans* from feline cryptococcosis. **Mycopathologia**, v.180, p.427-433, 2015.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L.M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v.35, p.51-58, 2007.

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

KIDD, S. E.; BACH, P. J.; HINGSTON, A. O.; MAK, S.; CHOW, Y.; MACDOUGALL, L.; KRONSTAD, J. W.; BARTLETT, K. H. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.51-7, 2007.

KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v.6, p.574–587, 2006.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; WICKES, B. L.; MEYER, W.; CUOMO, C. A.; WOLLENBURG, K. R.; BICANIC, T. A.; CASTAÑEDA, E.; CHANG, Y. C.; CHEN,

J.; COGLIATI, M.; DROMER, F.; ELLIS, D.; FILLER, S. G.; FISHER, M. C.; HARRISON, T. S.; HOLLAND, S. M.; KOHNO, S.; KRONSTAD, J. W.; LAZERA, M.; LEVITZ, S. M.; LIONAKIS, M. S.; MAY, R. C.; NGAMSKULRONGROJ, P.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; RICKERTS, V.; SORRELL, T. C.; WALSH, T. J.; WILLIAMSON, P. R.; XU, J.; ZELAZNY, A. M.; CASADEVALL, A. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **mSphere**, v.2, e00357-16, 2017.

LEVITZ, S.M.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*: The once-sleeping giant is fully awake. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.461–462, 2006.

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

LINARES, C.; COLOM, M. F.; TORREBLANCA, M.; ESTEBAN, V.; ROMERA, Á.; HAGEN, F. Environmental sampling of *Ceratonia siliqua* (carob) trees in Spain reveals the presence of the rare *Cryptococcus gattii* genotype AFLP7/VGIV. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p.269–272, 2015.

LIU, X.; WANG, Q.M; GÖKER, M; GROENEWALD, M; KACHALKIN, A.V; LUMBSCH, H.T.; MILLANES, A. M.; WEDIN, M.; YURKOV, A. M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F. Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in Mycology**, v.81, p.85-147, 2015a.

LIU, X.Z; WANG, Q.M; THEELEN, B; GROENEWALD, M; BAI, F.Y; BOEKHOUT, T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Studies in Mycology**, v.81, p.1-26, 2015b.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; BOLDEN, C. B.; DEBESS, E. E.; MARSDEN-HAUG, N.; WORHLE, R.; THAKUR, R.; HARRIS, J. R. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.73, p.144–148, 2012.

MARQUES, S. A.; BASTAZINI, I.; MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; BARBIERI D’ELIA, M. P.; LASTÓRIA, J. C.; MARQUES, M. E. A. Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients: primary cutaneous cryptococcosis. **International Journal of Dermatology**, v.51, p.780–784, 2012.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.189–195, 2003.

NASSER, N.; VIEIRA, A.G. Criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente. Primay cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.6, p.1178-1180, 2011.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v.30, p.599–609, 2012.

PAPPAS, P. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v.124, p.61-79, 2013.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, p.291–322, 2010.

RAJASINGHAM, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N.; GOVENDER, N. P.; CHILLER, T. M.; DENNING, D. W.; LOYSE, A.; BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v.17, p.873-81, 2017.

RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; CHOWDHARY, A.; PREETI SINHA, K.; KHAN, Z. U.; SUN, S.; Xu, J. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. **Medical Mycology**, v.46, p.823–833, 2008.

REOLON, A.; PEREZ, L.R.R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.5, p.29-33, 2004.

SINGH, N.; ALEXANDER, B. D.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F.; GUPTA, K. L.; JOHN, G. T.; DEL BUSTO, R.; KLINTMALM, G. B.; SOMANI, J.; LYON, G. M.; PURSELL, K.; STOSOR, V.; MUNOZ, P.; LIMAYE, A. P.; KALIL, A. C.; PRUETT, T. L.; GARCIA-DIAZ, J.; HUMAR, A.; HOUSTON, S.; HOUSE, A. A.; WRAY, D.; ORLOFF, S.; DOWDY, L. A.; FISHER, R. A.; HEITMAN, J.; WAGENER, M. M.; HUSAIN, S.; Cryptococcal collaborative transplant study group. *Cryptococcus neoformans* in organ transplant recipients: impact of calcineurin-inhibitor agents on mortality. **Journal of Infectious Diseases**, v.195, p.756–764, 2007.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.2804–2815, 2009.

TAKAHARA, D. T.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; PAULA, D. A.; NAKAZATO, L.; ANZAI, M. C.; LEITE JÚNIOR, D. P.; PAULA, C. R.; HAHN, R. C. First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.55, p.371-376, 2013.

TRILLES, L.; MEYER, W.; WANKE, B.; GUARRO, J.; LAZÉRA, M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. **Medical Mycology**, v.50, p.328–332, 2012.

VANHOVE, M.; BEALE, M. A.; RHODES, J.; CHANDA, D.; LAKHI, S.; KWENDA, G.; MOLLOY, S.; KARUNAHARAN, N.; STONE, N.; HARRISON, T. S.; BICANIC, T.; FISHER, M. C. Genomic epidemiology of *Cryptococcus* yeasts identifies adaptation to environmental niches underpinning infection across an African HIV/AIDS cohort. **Molecular Ecology**, v.26, p.1991-2005, 2016.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.2303–2311, 2010.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y-P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection & Immunity**, v.77, p.4345–4355, 2009.

VÉLEZ, N.; ESCANDÓN, P. Report on novel environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia: *Tabebuia guayacan* and *Roystonea regia*. **Medical Mycology**, v.55, p.794-797, 2017.

VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; KENNO, S.; PERITO, S.; CENCI, E.; MONARI, C. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiology**, v.8, p.1107–1116, 2013.

VOELZ, K. *et al.* Transmission of hypervirulence traits via sexual reproduction within and between lineages of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **PLOS Genetics**, v.9, e1003771, 2013.

VU, K.; THAM, R.; UHRIG, J. P.; THOMPSON, G. R.; NA POMBEJRA, S.; JAMKLANG, M.; BAUTOS, J. M.; GELLI, A. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **mBio**, v.5, e01101-14, 2014.

CAPÍTULO II – ISOLAMENTO AMBIENTAL DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. EM CURITIBA-PR

1. RESUMO

Criptococose é uma infecção fúngica sistêmica causada pela levedura *Cryptococcus* spp., a infecção é adquirida através da inalação de propagulos infecciosos presentes no meio ambiente. O gênero *Cryptococcus* está amplamente distribuído no ambiente, podendo ser encontrado em solo, excretas de aves, poeira, água, ar e madeira em decomposição. Este estudo teve como objetivo identificar as fontes ambientais de *Cryptococcus* sp. em Curitiba-PR. Amostras de excretas de aves, madeira em decomposição, cascas de árvores, solo e estruturas de madeira (banco, ponte, brinquedos) foram coletadas e processadas pelas técnicas de sedimentação e “swab”. Colônias úmidas, brilhantes, marrons e creme foram separadas e sua morfologia foi verificada por visualização no microscópio óptico com tinta Nanquim. A identificação bioquímica foi realizada por Vitek® 2 YST ID e a identificação molecular por sequenciamento das regiões ITS do rDNA. O total de 513 amostras ambientais foram processadas, destas, 19 (3.7%) foram positivas para a presença de *Cryptococcus* spp.. Os nichos ambientais positivos foram estruturas de madeira como brinquedos de parquinho de crianças ($n=6$), bancos ($n=2$), cercados ($n=2$) e floreiras ($n=1$), cascas de árvores dos gêneros *Acer* sp. ($n=1$), *Anadenanthera* sp. ($n=1$), *Tipuana* sp. ($n=1$), *Schinus* sp. ($n=1$) e *Ficcus* sp. ($n=1$), excretas de aves ($n=1$), solo ($n=1$) e madeira em decomposição ($n=1$). De acordo com o sequenciamento os isolados foram identificados como *C. laurentii* ($n=17$), *C. terrestris* ($n=1$) e *C. albidus* ($n=1$). Concluindo, os nichos ambientais de isolamento de *Cryptococcus* spp. em Curitiba-PR foram estruturas de madeira encontrados nos parques da cidade, solo, madeira em decomposição, excretas de aves e cascas de *Acer* sp., *Anadenanthera* sp., *Tipuana* sp., *Schinus* sp. e *Ficcus* sp.. A espécie mais frequentemente isolada foi *C. laurentii*, seguida de *C. terrestris* e *C. albidus*.

Palavras chave: *Cryptococcus* spp., *C. laurentii*, isolamento ambiental, criptococose, identificação molecular, Vitek.

2. INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans sensu lato (s.l.) pode ser isolado principalmente de excretas de aves, especialmente de pombos (*Columba livia*), que são encontrados com facilidade no perímetro urbano, mas também de aves passeriformes e psitaciformes que podem viver em ambiente doméstico (LUGARINI et al., 2008). A permanência destas aves nas cidades leva ao acúmulo de excretas, que eleva consideravelmente o risco de infecção para humanos e animais (FARIA et al., 2010). No Brasil o isolamento desta espécie a partir de excretas de pombos já foi relatado nos estados Pará (COSTA et al., 2009), Mato Grosso (TAKAHARA et al., 2013), Mato Grosso do Sul (FILIU et al., 2002), Goiás (SOUZA et al., 2009), Minas Gerais

(ANDRADE-SILVA et al., 2013), Espírito Santo (RIBEIRO et al., 2008), Rio de Janeiro (BARONI et al., 2006), São Paulo (PEDROSO et al., 2009), Rio Grande do Sul (REOLON et al., 2004) e Paraná (CHICHON, 2006; LUGARINI et al., 2008).

Os primeiros isolamentos ambientais de *C. gattii s.l.* foram obtidos a partir de árvores de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália, indicando uma associação específica entre *C. gattii s.l.* e *E. camaldulensis* naquela região (ELLIS, PFEIFFER, 1990). Em outras regiões do mundo, o isolamento de *C. gattii sensu lato* a partir de eucalipto é raro, podendo ser isolado de outras espécies de árvores. No Brasil pode ser encontrada em *Adenantha pavonina*, *Cassia grandis*, *Erythrina velutina*, *E. camaldulensis*, *E. Microcorys*, *Eucalyptus* spp., *Ficus* spp., *Guettarda acrena*, *Moquilea tomentosa* (SPRINGER, CHATURVEDI, 2010). Isto demonstra que as espécies de eucalipto não representam o único nicho ambiental do complexo de espécies *C. gattii* no mundo.

Tendo em vista o exposto acima, este capítulo tem como objetivo identificar as diferentes fontes ambientais de *Cryptococcus* spp. na cidade de Curitiba-PR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA AMBIENTAL

Um total de 513 amostras ambientais foram coletadas no período de março a agosto de 2017, nas áreas urbanas do município de Curitiba-PR, em locais como Parque Barigüí ($n=98$), Zoológico ($n=89$), Jardim Botânico ($n=67$), Bosque João Paulo II ($n=66$), Parque São Lourenço ($n=57$), Passeio Público ($n=45$), Parque Tingui ($n=39$), Parque Tanguá ($n=30$), área externa do Hospital de Clínicas-UFPR ($n=16$), Campus Reitoria-UFPR ($n=4$) e Círculo Militar ($n=2$). As amostras de cascas de árvores ($n=242$), estruturas de madeira ($n=112$; brinquedos para crianças, pontes, floreiras, cercado e bancos), solo ($n=87$), madeira em decomposição ($n=30$), excretas de aves ($n=14$), ocos de árvores ($n=13$), folhas ($n=4$), sementes ($n=4$), flores ($n=2$) e serapilheira ($n=2$) foram coletadas e enviadas para o Laboratório de Microbiologia-LabMicro/UFPR à temperatura ambiente, onde se realizou o isolamento das leveduras de interesse (FIGURA 1).



FIGURA 1 - A, B, C – oco de árvores; D – serrapilheira; E – madeira em decomposição; F, G – armazenamento do material para transporte
 FONTE: o autor

3.2 TÉCNICA DE ISOLAMENTO

Utilizou-se as técnicas de isolamento com “swab” e sedimentação descritas por Randhawa e colaboradores (2005), com adaptações. Na primeira técnica, utilizou-se “swabs” esterilizados para fazer a coleta das amostras ambientais através da fricção no material de interesse, em seguida, o “swab” foi imerso em tubos de ensaio contendo 10 mL de salina 0.8%. O material foi agitado em vortex por 2 minutos, o “swab” foi removido e a suspensão permaneceu em repouso por 30 minutos. Em seguida 100 μ L da suspensão foram inoculados em placas de ágar Níger

suplementado com 50 mg L⁻¹ de cloranfenicol e 100 mg L⁻¹ de estreptomicina, e foram incubados a 26°C ± 2 por 10 dias, com inspeções diárias do crescimento.

Na técnica de sedimentação, 1 g de cada amostra foi adicionado em frascos contendo 50 mL de salina 0.8% suplementada com 20 mg L⁻¹ de cloranfenicol. O material foi agitado em vortex por 2 minutos e permaneceu em repouso por 30 minutos. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi dissolvido em 9 mL de salina 0.8% e 100 mL desta suspensão foi inoculado em uma placa de ágar Níger suplementado com 50 mg L⁻¹ de cloranfenicol e 100 mg L⁻¹ de estreptomicina. As placas foram incubadas a 35°C ± 2 por 10 dias, com inspeções diárias do crescimento.

Colônias com aspecto brilhante, cremoso ou mucoide, de coloração marrom ou creme foram selecionadas para repique posterior em ágar Sabouraud, seguido de incubação 35°C ± 2 por 72 horas (LACAZ, 2002). Em seguida foram realizadas as identificações micromorfológica, bioquímica e molecular.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

3.3.1 Identificação micromorfológica

As colônias foram visualizadas no microscópio óptico em lâminas contendo 1 gota de tinta Nanquim, para a seleção de isolados que apresentavam células leveduriformes esféricas envolvidas por cápsula polissacarídica (LACAZ, 2002).

3.3.2 Identificação bioquímica

Utilizou-se o cartão de identificação de leveduras patogênicas Vitek® 2 YST ID (Biomérieux), seguindo as instruções de preparo do fabricante. Os isolados foram cultivados em ágar batata dextrose por 24 horas à 30°C. Em seguida, foi preparado uma suspensão de levedura, em solução salina 0.5% fornecida no kit de identificação, ajustando a turbidez entre 1.8 – 2.2 de densidade ótica em densitômetro. A suspensão foi colocada em contato com o cartão teste e levada para o aparelho Vitek® 2 Compact (Biomérieux), onde foi incubado por 24 horas. O resultado da identificação foi verificado após o período de incubação indicado pelo sistema.

O meio de cultura contendo canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB) também foi utilizado para a caracterização bioquímica dos isolados obtidos no isolamento ambiental (LACAZ, 2002; KWON-CHUNG, VARMA, 2006).

3.3.3 Identificação molecular

O sequenciamento das regiões ITS do rDNA foi utilizado para a identificação molecular dos isolados. O DNA total foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Vicente e colaboradores (2008), que consiste em maceração das células fúngicas com sílica/celite (2:1) na presença de brometo de cetil-trimetilamônio e extração do DNA em solução ácida de clorofórmio álcool isoamílico (24:1). Em seguida o DNA foi precipitado em etanol 96°GL e lavado em etanol 70°GL. Para o sequenciamento das regiões ITS foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). O produto da amplificação foi purificado com isopropanol 75°GL. As sequências foram obtidas através do Sequenciador Genético de DNA ABI3500, editadas nos programas BioEdit (HALL, 1999) e MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013). Após editadas, as sequências foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados "ISHAM barcoding database" (<http://its.mycologylab.org>).

4. RESULTADOS

Um total de 513 amostras foram processadas, 351 pela técnica com "swab" e 162 pela técnica de sedimentação. Pela técnica de sedimentação 3 (1.8%) amostras foram positivas para *Cryptococcus* spp. e pela técnica de coleta com "swab" 16 (4.5%) amostras foram positivas (TABELA 1). Considerando a frequência de isolamento entre as 513 amostras processadas, obteve-se 3.7% ($n=19$) de amostras positivas para *Cryptococcus* spp. Os nichos ambientais positivos para isolamento de *Cryptococcus* spp. foram estruturas de madeira como brinquedos de parquinho de crianças ($n=6$), bancos ($n=2$), cercados ($n=2$) e floreiras ($n=1$), cascas de árvores dos gêneros *Acer* sp. ($n=1$), *Anadenanthera* sp. ($n=1$), *Tipuana* sp. ($n=1$), *Schinus* sp. ($n=1$) e *Ficus* sp. ($n=1$), excretas de aves ($n=1$), solo ($n=1$) e madeira em decomposição ($n=1$), como apresentado na tabela 1.

Morfologicamente, as células dos isolados obtidos apresentaram-se esféricas e com cápsula quando visualizados ao microscópio óptico com tinta Nanquim. O cartão de identificação bioquímica Vitek® 2 YST ID (Biomérieux) identificou os isolados como *C. laurentii* ($n=17$), *C. albidus* ($n=1$) e um isolado apresentou baixa discriminação na identificação. De acordo com o sequenciamento das regiões ITS do rDNA os isolados foram identificados como *C. laurentii* ($n=17$), *C. terrestris* ($n=1$) e *C. albidus* ($n=1$).

5. DISCUSSÃO

A frequência de isolamento de *Cryptococcus* spp. do ambiente é variável e leva em consideração o clima, a vegetação, a região do país que se pretende investigar, o tipo de amostra e qual espécie se pretende isolar. No Brasil, estudos sobre isolamento ambiental de *Cryptococcus* spp. têm encontrado positividade em poeira doméstica e de bibliotecas, com porcentagens de isolamento variando entre 6% a 21.4% (LEITE et al., 2012; BRITO-SANTOS et al., 2015). Outros trabalhos investigaram a presença de *Cryptococcus* spp. em excretas de aves no ambiente urbano, e encontraram frequências que variam entre 13,9% a 37,8% (SOARES et al., 2005; BARONI et al., 2006). E ainda, trabalhos que buscam as fontes ambientais de *C. gattii* s.l. em diferentes espécies de árvores e matéria orgânica em decomposição obtiveram frequências que variaram entre 1.3% a 3% (BALTAZAR, RIBEIRO, 2013; ANZAI et al., 2014). Comparando com estes trabalhos, a frequência de isolamento do presente estudo foi baixa, com apenas 3.7% de positividade entre as amostras processadas. A baixa frequência de isolamento pode ser justificada pela ocorrência microfocal de *Cryptococcus*, ou seja, em um mesmo nicho podem haver áreas positivas e negativas para a presença do fungo (ALVAREZ et al., 2013).

Nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil o isolamento de *C. gattii* s.l. do ambiente é raro quando comparado ao isolamento de *C. neoformans* s.l., entretanto, o complexo de espécie *C. gattii* tem sido mais prevalente nas regiões norte e nordeste (NISHIKAWA et al., 2003; TRILLES et al., 2008). As espécies de *Cryptococcus* spp. isoladas no presente estudo foram *C. albidus*, *C. terrestris* e *C. laurentii*. Apesar das espécies dos complexos *C. neoformans*/*C. gattii* serem os principais agentes etiológicos da criptococose (DEBOURGOGNE et al., 2012), outras

espécies podem ser responsáveis por causar a doença em humanos. A espécie *C. diffluens* já foi relatada como causadora de criptococose subcutânea em um paciente aparentemente imunocompetente (KANTARCIOĞLU et al., 2007). *Cryptococcus albidus* foi isolado de ceratite em um paciente imunocompetente (HUANG et al., 2015), encefalite em um paciente infectado pelo vírus HIV (LIU et al., 2014) e fungemia em um paciente transplantado (CLEVELAND et al., 2013).

A espécie mais frequentemente isolada das amostras ambientais neste estudo foi *C. laurentii*. Recentemente, houve a revisão taxonômica dos fungos da classe dos Tremelomicetos e esta espécie foi classificada como *Papilliotrema laurentii* (LIU et al., 2015a; LIU et al., 2015b). Esta espécie é reconhecida como saprófito, porém nos últimos anos vários casos de infecções em humanos têm sido relatados (KULKARNI et al., 2012; MOLINA-LEYVA et al., 2012; CONTI et al., 2015), o que torna o isolamento a partir do ambiente um dado importante (BALTAZAR & RIBEIRO, 2008). Molina-Leyva e colaboradores (2012) relataram um caso de criptococose cutânea primária por *C. laurentii* em uma criança imunocompetente. Além disso, outras manifestações clínicas foram observadas em infecções por *C. laurentii*, como meningoencefalite em paciente com AIDS (MANFREDI et al., 2006) e fungemia em paciente imunocompetente (BANERIEE et al., 2013). Esta espécie apresenta colônias de coloração bege em ágar Níger o que demonstra sua baixa produção de melanina, em contrapartida, exibe atividade hemolítica, fato que sugere seu potencial patogênico e capacidade de multiplicação no sangue (FERREIRA-PAIM et al., 2012). No presente trabalho, *C. laurentii* foi isolado principalmente de estruturas de madeira localizadas nos parques da cidade de Curitiba-PR, como brinquedos de criança, bancos, floreiras e cercados de madeira, que são objetos que estão em constante contato com a população, atuando como fonte de infecção para *C. laurentii*. Ainda, esta espécie foi isolada de cascas de árvores dos gêneros *Anadenanthera* sp., *Tipuana* sp., *Acer* sp. e *Schinus* sp. que estão distribuídas amplamente pelos parques de Curitiba-PR. E como relatado no trabalho de Fillion e colaboradores (2006), *C. laurentii* também foi isolado a partir de excretas de aves, isso demonstra a ampla variedade de nichos ambientais relacionados com este fungo.

Em conclusão, os nichos ambientais de *Cryptococcus* spp. identificados em Curitiba-PR foram estruturas de madeira como brinquedos de parquinho de criança, bancos, cercados e floreiras, cascas de árvores dos gêneros *Acer* sp., *Anadenanthera* sp., *Tipuana* sp., *Schinus* sp. e *Ficcus* sp., excretas de aves, solo e madeira em

decomposição. A espécie *C. laurentii* foi a mais frequentemente isolada destes nichos, seguida de *C. terrestris* e *C. albidus*.

TABELA 1 – Informações sobre os isolados de *Cryptococcus* spp. obtidos no isolamento ambiental

Código	Fonte de isolamento	Local de isolamento	Técnica de isolamento	Identificação Vitek	CGB	Niger	Identificação ITS
P1.1	Estrutura de madeira (brinquedo)	Parque Barigui	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P3.1	Estrutura de madeira (brinquedo)	Parque Barigui	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P4	Estrutura de madeira (brinquedo)	Parque Barigui	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P5.8	Estrutura de madeira (brinquedo)	Parque Barigui	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P11.1	Estrutura de madeira (brinquedo)	Parque Barigui	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P14.4	Estrutura de madeira (brinquedo)	Parque Barigui	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
A81	Casca de <i>Anadenanthera</i> sp.	Parque Barigui	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
A17s.1	Casca de <i>Tipuana</i> sp.	Parque Tingui	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
F3	Excretas de aves	Parque Tingui	Sedimentação	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
A29s.1	Casca de Acer sp.	Bosque João Paulo II	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
C47.2	Casca de <i>Schinus</i> sp.	Bosque João Paulo II	Sedimentação	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P42s	Estrutura de madeira (banco)	Passo Público	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P52s	Estrutura de madeira (floreira)	Parque São Lourenço	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P61	Estrutura de madeira (cercado)	Zoológico	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P62	Estrutura de madeira (cercado)	Zoológico	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P66s.2	Madeira em decomposição	Parque Tanguá	Swab	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
S82	Solo	Parque Tanguá	Sedimentação	<i>C. laurentii</i>	positivo	negativo	<i>C. laurentii</i>
P71s	Estrutura de madeira (banco)	Hospital de Clínicas - UFPR	Swab	Baixa discriminação	negativo	negativo	<i>C. laurentii</i>
A74	Casca de <i>Ficus</i> sp.	Hospital de Clínicas - UFPR	Swab	<i>C. albidus</i>	negativo	negativo	<i>C. albidus</i>

FONTE: o autor

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, C.; BARBOSA, C.G.; OLIVEIRA, R.V.C.; MORALES, B.P.; WANKE, B.; LAZÉRA, M.S. Techniques for the detection of pathogenic *Cryptococcus* species in wood decay substrata and the evaluation of viability in stored samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, p.126-129, 2013.
- ANDRADE-SILVA, L.; FERREIRA-PAIM, F.; MORA, D. J.; SILVA, P. R.; ANDRADE, A. A.; ARAUJO, N. E.; PEDROSA, A. L.; SILVA-VERGARA, M. L. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v.51, p.635-640, 2013.
- ANZAI, M. C.; LAZÉRA, M. DOS S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; DE PAULA, D. A.; NAKAZATO, L.; TAKAHARA, D. T.; SIMI, W. B.; HAHN, R. C. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v.57, p.414-418, 2014
- BALTAZAR, L.M.; RIBEIRO, M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.41, p.449-453, 2008.
- BANERJEE, P.; HAIDER, M.; TREHAN, V.; MISHRA, B.; THAKUR, A.; DOGRA, V.; LOOMBA, P. *Cryptococcus laurentii* fungemia. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.31, p.75–77, 2013.
- BARONI, F.A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.G.; OLIVEIRA, M.T.B.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.48, p.71-75, 2006.
- BRITO-SANTOS, F.; BARBOSA, G.L.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B.; MEYER, W.; CARVALHO-COSTA, F.A.; LAZÉRA, M.S. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor Dust from typical wooden houses in the deep amazonas of the Rio Negro Basin. **Plos One**, v.10, e0115866, 2015.
- CICHON, M. **Suscetibilidade a drogas antifúngicas de isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans*, procedentes da cidade de Curitiba e região metropolitana, Paraná, Brasil**. Paraná, 2006. 38 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- CLEVELAND, K.O.; GELFAND, M.S.; RAO, V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to *Cryptococcus albidus* in a liver transplant recipient, **QJM: An International Journal of Medicine**, v.106, p.361–362, 2013.
- CONTI, F.; SPINELLI, F.R.; COLAFRANCESCO, S.; TRUGLIA, S.; CECCARELLI, F.; FATTAPPOSTA, F.; SORICE, M.; CAPOZZI, A.; FERRETTI, G.; PRIORI, R.; MARTINELLI, F.; PIRONE, C.; ALESSANDRI, C.; VALESINI, G. Acute longitudinal

myelitis following *Cryptococcus laurentii* pneumonia in a patient with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.24, p.94-97, 2015.

COSTA, S.P.S.E.; LAZÉRA, M. S.; SANTOS, W. R. A.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; NISHIKAWA, M. M.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from ambient sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.662-664, 2009.

DEBOURGOGNE, A.; HAGEN, F.; ELENGA, N.; LONG, L.; BLANCHET, D.; VERON, V.; LORTHOLARY, O.; CARME, B.; AZNAR, C. Successful treatment of *Cryptococcus gattii* neurocryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent child from the French Guiana Amazon region. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.210-213, 2012.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.1642-1644, 1990.

FARIA, R.O.; NASCENTE, P. S.; MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; ANTUNES, T. A.; SILVEIRA, E. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, estado do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.43, p.198-200, 2010.

FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L.; MORA, D. J.; LAGES-SILVA, E.; PEDROSA, A. L.; SILVA, P. L.; ANDRADE, A. A.; SILVA-VERGARA, M. L. Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v.174, p.41-52, 2012.

FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. **Mycopathologia**, v.162, p.363-368, 2006.

FILIU, W.F.O.; WANKE, B.; AGUENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.L.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.35, p.591-595, 2002.

FIRACATIVE, C.; TORRES, G.; RODRÍGUEZ, M.C.; ESCANDÓN, P. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. **Biomédica**, v.21, p.118-123, 2011.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HUANG, Y-H.; LIN, I-H.; CHANG, T-C.; TSENG, S-H. Early diagnosis and successful treatment of *Cryptococcus albidus* keratitis: a case report and literature review. **Medicine**, v.94, e885, 2015.

KANTARCIOĞLU, A. S.; BOEKHOUT, T.; DE HOOG, G. S.; THEELEN, B.; YÜCEL, A.; EKMEKCI, T. R.; FRIES, B. C.; IKEDA, R.; KOSLU, A.; ALTAS, K. Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluens* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and *in vitro* antifungal susceptibilities. **Medical Mycology**, v.45, p.173-181, 2007.

KULKARNI, A.; SINHA, M.; ANANDH, U. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus laurentii* in a renal transplant recipient. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v.23, p.102-105, 2012.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINZ_VACCARI E.M., MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9. edição, 2002. São Paulo, SP: Sarvier. p. 416-435.

LEITE, D.P.; AMADIO, J.V.R.S.; MARTINS, E.R.; SIMOES, S.A.A.; YAMAMOTO, A.C.A.; LEALSANTOS, F.A.; TAKAHARA, D.T.; HAHN, R.C. *Cryptococcus* spp. isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v.7, p.1-7, 2012.

LIU, Y.; MA, S.; WANG, X.; XU, W.; TANG, J. *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. **Medical Mycology Case Reports**, v.3, p.8-10, 2014.

LIU, X.; WANG, Q.M; GÖKER, M; GROENEWALD, M; KACHALKIN, A.V; LUMBSCH, H.T.; MILLANES, A. M.; WEDIN, M.; YURKOV, A. M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F. Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomyces*. **Studies in Mycology**, v.81, p.85-147, 2015a.

LIU, X.Z; WANG, Q.M; THEELEN, B; GROENEWALD, M; BAI, F.Y; BOEKHOUT, T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Studies in Mycology**, v.81, p.1-26, 2015b.

LUGARINI, C.; GOEBEL, C.S.; CONDAS, L.A.Z.; MURO, M.D.; FARIAS, M.R.; FERREIRA, F.M.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.166, p.61–69, 2008.

MANFREDI, R.; FULGARO, C.; SABBATANI, S.; LEGNANI, G.; FASULO, G. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. **AIDS Patient Care STDS**, v.20, p.227-32, 2006.

MOLINA-LEYVA, A.; RUIZ-CARRASCOSA, J.C.; LEYVA-GARCIA, A.; HUSEIN-ELAHMED, H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. **International Journal of Infectious Diseases**, v.17, e1232–e1233, 2012.

NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and

environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.73-77, 2003.

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

RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; KHAN, Z. U. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. **Medical Mycology**, v.43, p.67-71, 2005.

REOLON, A.; PEREZ, L.R.R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, p.29-33, 2004.

RIBEIRO, M.A.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.50, p.315-320, 2008.

SOARES, M.C.B.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.T.; CASEIRO, M.M.; COSTA, S.O.P. Ambiental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.47, p.31-36, 2005.

SOUZA, L.K.H.; SOUZA-JUNIOR, A.H.; COSTA, C.R.; FAGNELLO, J.; VAINSTEIN, M.H.; CHAGAS, A.L.B.; SOUZA, A.C.M.; SILVA, M.R.R. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v.53, p.62-67, 2009.

SPRINGER, D.J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.14-20, 2010.

TAKAHARA, D.T.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; PAULA, D. A. J.; NAKAZATO, L.; ANZAI, M. C.; LEITE JÚNIOR, D. P.; PAULA, C. R.; HAHN, R. C. First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.55, p.371-376, 2013.

TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. DOS S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.455-562, 2008.

VICENTE, V.A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.

Ambiental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v.61, p.137–144, 2008.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), p. 315–322. Academic Press, San Diego, 1990.

CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS “IN VITRO” DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS DEUTEROGATTII*

HERKERT PF, HAGEN F, DE OLIVEIRA SALVADOR GL, GOMES RR, FERREIRA MS, VICENTE VA, MURO MD, PINHEIRO RL, MEIS JF, QUEIROZ-TELLES F. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.35, p.1803-1810, 2016.

1. RESUMO

A criptococose causada por *Cryptococcus gattii sensu lato* é uma doença emergente, inicialmente encontrada em regiões de clima tropical e subtropical com recente expansão para regiões de clima frio e temperado. Infecções causadas por *C. gattii s.l.* são encontradas mais frequentemente em indivíduos saudáveis, sem imunossupressão aparente. Neste capítulo, 18 isolados clínicos de *C. gattii s.l.* foram caracterizados molecularmente pelas técnicas de amplificação de fragmento polimórfico, “mating-typing” e sequenciamento multi-locus, e ainda investigados quanto a suscetibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol e flucitosina. Observou-se que todos os isolados estudados foram da espécie *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII), dos quais 14 apresentavam “mating-type” α e 4 “mating-type” a . Observou-se que 10 isolados apresentaram um novo padrão de AFLP. As concentrações inibitórias mínimas para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol foram 0.063–0.25, 0.031–0.25, 0.031–0.25, 0.031–0.25 e <0.016 –0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os antifúngicos fluconazol e flucitosina apresentaram as maiores médias geométricas dos antifúngicos testados, 2.07 e 3.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A maior parte dos isolados do estudo, foram provenientes de pacientes imunocompetentes ($n=10$; 55.6 %) e o SNC ($n=14$; 77.8 %) foi o principal sítio acometido pela infecção. As análises moleculares mostraram que todos os isolados estudados pertencem a espécie *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII) e que dois novos padrões de AFLP foram encontrados entre os isolados estudados. A maioria dos isolados foram obtidos de pacientes imunocompetentes, cujo sítio mais acometido pela infecção foi o SNC. Todos os antifúngicos apresentaram atividade “in vitro” contra os isolados de *C. deuterogattii*.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, antifúngicos, AFLP, mating-type, MLST.

2. INTRODUÇÃO

Os complexos de espécies *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* são os principais agentes etiológicos da criptococose, uma doença sistêmica que acomete indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (DEBOURGOGNE et al., 2012). A taxonomia destes complexos foi recentemente revisada por Hagen e colaboradores (2015) e por Liu e colaboradores (2015), onde os genótipos/variedades passaram para o nível de espécies (HAGEN et al., 2015; LIU et al., 2015a; LIU et al., 2015b).

As espécies do complexo *C. gattii* eram encontradas inicialmente em regiões tropicais e subtropicais, porém ao longo dos anos foram relatadas a ocorrência em regiões de clima frio e temperado, inclusive causando surtos em humanos e animais

nestas regiões (KIDD et al., 2004; DATTA et al., 2009; GALANIS et al., 2010; BYRNES et al., 2011). Acredita-se que a distribuição deste fungo se deve ao seu transporte através de subprodutos de madeira, água, ar, animais, insetos e homem (KIDD et al., 2007a). Atualmente, as espécies do complexo *C. gattii* tem sido isoladas do meio ambiente a partir de diversos nichos ecológicos e de ampla variedade de espécies de árvores (KIDD et al., 2007b; SPRINGER & CHATURVEDI, 2010; CHOWDHARY et al., 2012; ANZAI et al., 2014; HAGEN et al., 2014; LINARES et al., 2015).

Considerando a distribuição das espécies do complexo *C. gattii*, nota-se que há variação quanto a distribuição mundial. *Cryptococcus gattii* s.s. é frequentemente encontrado na Europa, onde é responsável por infecções em humanos e animais (HAGEN et al., 2012). Na Ásia e Australasia *C. gattii* s.s. e *C. deuterogattii* predominam entre os isolados clínicos e ambientais (COGLIATI, 2013). *Cryptococcus tetragattii* tem sido isolado principalmente da África e Índia (NYAZIKA et al., 2016; COGLIATI, 2013). *Cryptococcus bacillisporus* e é encontrado nas Américas e raramente é isolado em outros continentes (CHOWDHARY et al., 2013; COGLIATI, 2013). A espécie *C. deuterogattii* predomina tanto em amostras ambientais, quanto em amostras clínicas no continente americano (COGLIATI, 2013), e recentemente, observou-se que a linhagem ancestral desta espécie teve origem no deserto semiárido brasileiro (SOUTO et al., 2016).

Além da variação na distribuição geográfica, as espécies de *Cryptococcus* spp. apresentam variações na suscetibilidade aos antifúngicos “in vitro”. *Cryptococcus gattii* s.l. responde à concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngico mais alta que o complexo *C. neoformans*; e, geralmente, flucitosina e fluconazol têm atividade reduzida contra isolados da espécie *C. deuterogattii* (ESPINEL-INGROFF et al., 2012a; ESPINEL-INGROFF et al., 2012b; ESPINEL-INGROFF et al., 2015).

O objetivo deste capítulo é caracterizar molecularmente isolados clínicos de *C. gattii* s.l. e testar a suscetibilidade dos mesmos à antifúngicos comumente utilizados na clínica para o tratamento da criptococose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS E INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Para este trabalho, utilizou-se 18 isolados clínicos de *C. gattii s.l.*, previamente identificados com ágar Níger, ágar CGB e tinta Nanquim e armazenados em Skim Milk à -80°C no Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil. Os isolados foram coletados durante o período de 1999 a 2015. A revitalização foi realizada em ágar Sabouraud, seguida de incubação por 72 horas à 37°C. Após o período de incubação, apenas uma colônia foi transferida para um novo cultivo e utilizada posteriormente nos testes de caracterização molecular e suscetibilidade à antifúngicos “in vitro”. As informações clínicas dos pacientes dos quais obteve-se os isolados, foram coletadas dos prontuários médicos disponíveis para consulta. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR, CAAE: 32599414.0.0000.0096.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

3.2.1 Extração do DNA genômico

A quantidade correspondente a, aproximadamente, 1 cm² de cultura foi adicionada em 300 µL de tampão de lise (Roche Diagnostics, Almere, Holanda) seguida de lise mecânica no equipamento MagNA Lyser (Roche Diagnostics) e centrifugação por 2 minutos à 12.000 × *g*, seguida de inativação por aquecimento à 100°C por 10 minutos. Após a inativação, 200 µL da solução foi utilizada para a extração automatizada de DNA na plataforma MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics) com volume de eluição final de 100 µL (ILLNAIT-ZARAGOZÍ et al., 2012).

3.2.2 Determinação do *mating-type*

O *mating-type* dos isolados foi determinado a partir da amplificação parcial do locus *STE12* de acordo com a metodologia descrita por Hagen e colaboradores (2010). As linhagens de *C. gattii s.l.* CBS6956 e CBS10510 (*mating-type* α), e

CBS1930 e CBS11233 (*mating-type a*) foram incluídas nas análises como controles positivos (HAGEN & BOEKHOUT, 2010).

3.2.3 Genotipagem AFLP

Esta análise foi utilizada para genotipar e identificar os isolados, utilizando a metodologia descrita previamente por Boekhout e colaboradores (2001). Os dados gerados foram analisados no software BioNumerics versão 7.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) utilizando coeficiente de correlação de Pearson e algoritmo UPGMA para agrupamento. Os fragmentos de DNA com tamanhos variando entre 20 bp e 600 bp foram inclusos nas análises. As linhagens referência WM179 (*C. gattii* s.s., genótipo AFLP4/VGI), WM161 (*C. bacillisporus*, genótipo AFLP5/VGIII), WM178 (*C. deuterogattii*, genótipo AFLP6/VGII), WM779 (*C. tetragattii*, genótipo AFLP7/VGIV) e IHEM14941 (*C. decagattii*, genótipo AFLP10/VGIV) foram utilizadas como controles positivos para a determinação de cada genótipo de AFLP (NYAZIKA et al., 2016).

3.2.4 Sequenciamento multi-locus

Os loci *CAP59*, *GPD1*, *IGS1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1* e *URA5* foram sequenciados parcialmente, seguindo o esquema consenso para MLST (HAGEN et al., 2012). O kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.) foi utilizado nas as reações de sequenciamento e o equipamento ABI 3500xL (Applied Biosystems) foi utilizado para gerar as sequências. O software SeqScan (Applied Biosystems) foi utilizado para editar as sequências, que posteriormente foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados *Cryptococcus* MLST (<http://mlst.mycologylab.org>). O alinhamento foi feito na plataforma on-line MAFFT (KATO et al., 2002) com inspeção visual no software MEGA versão 7 (KUMAR et al., 2016). A construção da árvore filogenética foi baseada em análises de máxima verossimilhança com 1000 repetições de *bootstrap*, utilizando um subconjunto de dados de MLST que compreende todos os tipos conhecidos de sequência de *C. deuterogattii* (NYAZIKA et al., 2016).

3.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo padrão determinado pelo *Clinical and laboratory standards institute/M27-A3* (CLSI, 2008). Os antifúngicos testados foram anfotericina B (Bristol Myers Squibb, Munique, Alemanha), fluconazol (Pfizer, Sandwich, Reino Unido), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica), voriconazol (Pfizer), posaconazol (Merck, NJ, E.U.A.), isavuconazol (Basilea Pharmaceutica, Basel, Suíça) e flucitosina (ICN Pharmaceuticals, Zoetermeer, Holanda). As concentrações antifúngicas testadas foram 0.016 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol; e 0.062 a 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluconazol e flucitosina. Os isolados de *C. gattii s.l.* foram cultivados em ágar Sabouraud por 48 horas à 30°C e os inoculos foram ajustados para 1×10^3 UFC/mL em salina 0.9%. As placas de microdiluição foram incubadas por 72 horas à 35°C e as CIMs foram definidas como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento para anfotericina B e capaz de reduzir 50% do crescimento fúngico na presença dos outros antifúngicos, quando comparados com os controles de crescimento livres de antifúngicos. As linhagens referência *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controle de qualidade do teste (CLSI, 2008). A interpretação dos valores de CIM foi baseada nos valores epidemiológicos de corte (ECV) de acordo com a literatura (ESPINEL-INGROFF et al., 2012a; ESPINEL-INGROFF et al., 2012b; ESPINEL-INGROFF et al., 2015), uma vez que o CLSI ainda não preconiza pontos de corte para *Cryptococcus* (TABELA 1). Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram obtidos ordenando os dados de cada antifúngico em ordem crescente e selecionando a mediana e o nonagésimo valor, respectivamente. A média geométrica de CIM foi calculada usando o software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, E.U.A.). Quando os valores de CIM foram maiores ou menores que as concentrações testadas, foram considerados valores de 1 log₂ maior ou 1 log₂ menor para calcular a média geométrica.

TABELA 1 – Valores epidemiológicos de corte para definição de *Cryptococcus deuterogattii sensu lato* (AFLP1/VNI) tipo-selvagem

Espécie	Antifúngico	ECV (CIM µg mL ⁻¹)		
		95% ^a	97.5% ^a	99% ^a
<i>C. neoformans</i> s.s. (AFLP1/VNI)	Anfotericina B	1	1	2
	Fluconazol	32	32	64
	Itraconazol	0.5	0.5	1
	Posaconazol	-	-	-
	Voriconazol	0.25	0.5	0.5
	Isavuconazol	0.25	0.25	-
	Flucitosina	16	16	16

ECV: valor epidemiológico de corte

^aECV calculado compreendendo 95%, 97.5% ou 99% da população estudada

FONTE: adaptado de Espinel-Ingroff e colaboradores (2012a; 2012b; 2015)

4. RESULTADOS

4.1 MATING-TYPE, GENÓTIPO E DIVERSIDADE GENÉTICA

As análises de *mating-type* mostraram que entre os 18 isolados estudados 14 foram *mating-type* α e 4 *mating-type* **a**. Nas análises de MLST os 18 isolados foram agrupados com a linhagem referência de *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII) (FIGURA 1), e são geneticamente relacionados com outros isolados brasileiros de *C. deuterogattii*. Um isolado (UFU986) foi geneticamente indistinguível da linhagem de genótipo AFLP6A/VGIIa responsável pelo surto que ocorreu no Canadá (FIGURA 1). As sequências MLST utilizadas neste estudo foram depositadas no banco de dados Genbank e estão disponíveis pelos seguintes números de acesso: KU642658-KU642671, KU642673-KU642676 (*CAP59*), KU642703-KU642716, KU642718-KU642721 (*GPD1*), KU642748-KU642761, KU642763-KU642766 (*IGS1*), KU642793-KU642806, KU642808-KU642811 (*LAC1*), KU642838-KU642851, KU642853-KU642856 (*PLB1*), KU642883-KU642896, KU642898-KU642901 (*SOD1*) e KU642928-KU642938, KU642940-KU652944, KU642946, KU642966 (*URA5*). Nas análises de AFLP, os 18 isolados estudados apresentaram os padrões de bandas da espécie *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII), sendo que 4 deles foram agrupados com a linhagem referência de *C. deuterogattii* (WM178), enquanto que os demais foram agrupados em dois clados distintos (FIGURA 2), representando dois novos padrões

de AFLP6 que foram separados da linhagem referência devido a presença de marcadores dominantes.

4.2 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os valores de CIM estão apresentados na tabela 2. Observou-se que itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol e anfotericina B apresentaram atividade contra os isolados de *C. deuterogattii*, com valores de CIM variando entre 0.031 a 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os três primeiros antifúngicos, <0.016 a 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para isavuconazol e 0.06 a 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B. Fluconazol e flucitosina apresentaram as maiores médias geométricas de CIM, 2.07 e 3.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

4.3 INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Dos 18 isolados estudados, 11 (61%) foram provenientes de pacientes masculinos e 6 (33%) de pacientes femininos, com idades variando entre 20 a 76 anos. Dez isolados (55.6%) foram recuperados de pacientes imunocompetentes e 4 (22.2%) de pacientes infectados com o vírus HIV. Além disso, cinco (27.7%) isolados foram provenientes de pacientes com infecção pulmonar e do SNC simultaneamente. E ainda, 2 (11.1%) isolados foram obtidos de criptococose cutânea. Sequelas neurológicas foram observadas em 3 (16.7%) pacientes, dentre elas hiperreflexia, disartria e disdiadococinesia; 1 paciente apresentou sequelas motoras em membros superiores e 1 apresentou anosmia. O tratamento da criptococose de 9 (50%) pacientes foi realizado com a terapia combinada de anfotericina B e fluconazol, 1 (5.5%) recebeu anfotericina B e itraconazol, 1 (5.5%) recebeu tratamento apenas com anfotericina B e 2 (11%) receberam isavuconazol. Anfotericina B lipossomal foi utilizada no tratamento de 2 (11%) pacientes que apresentaram nefrotoxicidade devido ao tratamento prévio com anfotericina B deoxicolato. As doses utilizadas para o tratamento de cada caso de criptococose e as informações clínicas dos pacientes estão apresentadas na tabela 3.

5. DISCUSSÃO

Infecções causadas pelas espécies do complexo *C. gattii* apresentam como principais manifestações clínicas pneumonia, meningoencefalite, lesões cutâneas e formação de criptococomas em pulmões e/ou cérebro (BYRNES et al., 2011; MARQUES et al., 2012; CICORA et al., 2015; FRANCO-PAREDES et al., 2015). Os criptococomas são de difícil tratamento e geralmente necessitam de intervenção cirúrgica (PERFECT et al., 2010; BYRNES et al., 2011). Ainda, infecções do SNC podem resultar em sequelas neurológicas, tais como deficiência visual, surdez, fraqueza de membros e disfagia (CHEN et al., 2012). Entre as sequelas que acometeram os pacientes envolvidos no estudo observou-se hiperreflexia, disartria, disdiadococinesia, anosmia e fraqueza de membros superiores. Alguns estudos observaram que 60-90% dos pacientes que apresentaram criptococose devido a espécies do complexo *C. gattii* desenvolveram manifestações clínicas pulmonares com envolvimento do SNC simultaneamente (GALANIS et al., 2010; CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2013). Já no presente trabalho, esta frequência foi menor, com apenas 27.7% dos casos tendo doença pulmonar e do SNC concomitantemente. As profissões desempenhadas por três pacientes podem ter contribuído como fator de risco para criptococose, como lenhador, repositora de supermercado e agricultor, pois estes, tinham constante contato com madeira e seus subprodutos e solo, que são nichos ambientais conhecidos das espécies do complexo *C. gattii* (KIDD et al., 2007a).

Todos os isolados analisados foram identificados como *C. deuterogattii*. No Brasil *C. deuterogattii* é a espécie do complexo *C. gattii* predominante entre amostras clínicas, veterinárias e ambientais em todas as regiões do país (SANTOS et al., 2008; COSTA et al., 2009; MARTINS et al., 2011; MATOS et al., 2012; SILVA et al., 2012; CARDOSO et al., 2013; ANZAI et al., 2014; HEADLEY et al., 2015). Porém, as espécies *C. gattii* s.s. e *C. bacillisporus* também estão envolvidas com casos de criptococose nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil (TRILLES et al., 2008). Apesar do aumento das investigações epidemiológicas em *Cryptococcus* no Brasil nos últimos anos, as informações sobre a distribuição das espécies nas diferentes regiões do país ainda estão fragmentadas e subestimadas, isto é resultado de, principalmente diagnóstico inadequado e deficiência no registro nacional de casos (MARTINS et al., 2011).

No presente trabalho, 4 dos 18 isolados de *C. deuterogattii* apresentaram *mating-type a*. A presença dos dois *mating-types* na população de *C. deuterogattii* da América do Sul demonstra que eventos de recombinação são comuns e podem ser a causa da diversidade genética observada nessa região quando comparada com outras localidades (HAGEN et al., 2013). A maioria dos isolados de *Cryptococcus* spp. distribuídos mundialmente apresentam *mating-type* α (HAGEN et al., 2013). Apesar das décadas de estudos epidemiológicos realizados na Austrália (região onde os primeiros isolamentos ambientais de espécies do complexo *C. gattii* foram realizados) apenas um único isolado de *C. deuterogattii mating-type a* foi encontrado (CARRICONDE et al., 2011). A ausência ou a baixa frequência de isolados *mating-type a* em uma população sugere que a reprodução do microrganismo está ocorrendo de forma clonal ou através da combinação entre o mesmo *mating-type* (FRASER et al., 2005).

Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos mostraram que a anfotericina B apresentou a melhor atividade contra *C. deuterogattii*, o que está em concordância com a literatura (IQBAL et al., 2010; ESPINEL-INGROFF et al., 2012b; PASA et al., 2012; FAVALESSA et al., 2014). Por outro lado, Hagen e colaboradores (2010) relataram baixa atividade de anfotericina B contra isolados de *C. deuterogattii* provenientes da Europa e América do Sul, contudo, os valores de CIM apresentados ainda estavam na faixa considerada como tipo-selvagem (ESPINEL-INGROFF et al., 2012b). Fluconazol apresentou a menor atividade antifúngica entre os triazólicos testados, com CIMs variando entre 0.5 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém, todos os valores de CIM estavam dentro do limite de ECV considerado tipo-selvagem (ESPINEL-INGROFF et al., 2012a; LOCKHART et al., 2012). Hagen e colaboradores (2010) também observaram baixa atividade antifúngica para fluconazol quando este foi testado contra as espécies do complexo *C. gattii*, com valores de CIM variando entre 0.125 a $>64 \mu\text{g mL}^{-1}$. Um estudo realizado no Brasil mostrou altos valores de CIM (2 – 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para fluconazol, com média geométrica de 6.08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando testados contra *C. deuterogattii* (TRILLES et al., 2012). Observou-se também que os antifúngicos itraconazol e os novos triazóis (voriconazol, posaconazol e isavuconazol) apresentaram baixos valores de CIM, como demonstrado anteriormente (HAGEN et al., 2010; IQBAL et al., 2010; ESPINEL-INGROFF et al., 2012a; ESPINEL-INGROFF et al., 2012b).

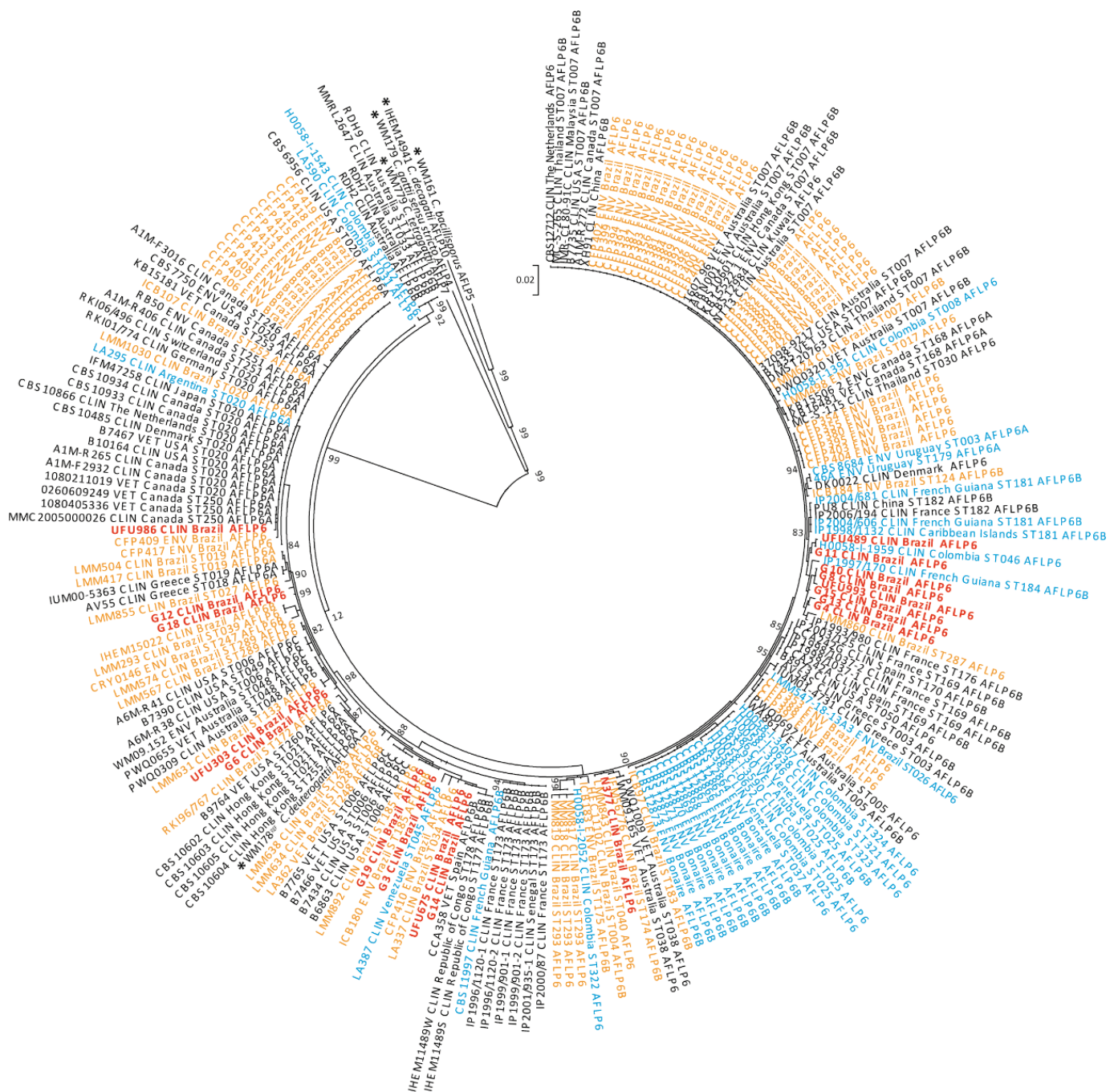


FIGURA 1 – Análise filogenética de máxima verossimilhança com 1000 repetições de *bootstrap* dos isolados de *C. deuterogattii* utilizando tipagem multi-locus. *Cryptococcus gattii sensu stricto* (WM179), *C. bacillisporus* 466 (WM161), *C. tetragattii* (WM779) e *C. decagattii* (IHEM1491) foram utilizadas como grupo externo. Vermelho: isolados do presente estudo; Laranja: outros isolados brasileiros; Azul: isolados da América Latina; Preto: isolados de outros países; *: linhagens de referência
 FONTE: o autor

TABELA 2 – Concentrações inibitórias mínimas de todos os isolados clínicos de *Cryptococcus deuterogattii* estudados

Código do isolado	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
	AMB	FLC	ITC	VOR	POS	ISA	5FC	
G3	0.063	0.5	0.063	0.063	0.063	0.031	4	
G4	0.125	8	0.25	0.25	0.25	0.25	8	
G6	0.031	8	0.125	0.125	0.125	0.063	2	
G8	0.031	2	0.125	0.063	0.063	0.063	4	
G10	0.125	4	0.125	0.125	0.125	0.125	8	
G11	0.063	0.5	0.031	0.031	0.031	<0.016	1	
G12	0.063	0.5	0.063	0.063	0.063	0.063	4	
G13	0.031	4	0.063	0.063	0.063	0.063	2	
G14	0.063	4	0.125	0.125	0.125	0.125	4	
G15	0.125	4	0.125	0.125	0.125	0.125	4	
G18	0.125	2	0.125	0.063	0.063	0.063	4	
G19	0.125	16	0.25	0.25	0.25	0.25	4	
N377	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.031	8	
UFU303	0.125	8	0.125	0.125	0.125	0.063	4	
UFU489	0.063	0.5	0.063	0.063	0.063	0.031	2	
UFU675	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.063	4	
UFU986	0.063	4	0.25	0.125	0.125	0.125	4	
UFU993	0.125	1	0.063	0.063	0.063	0.063	4	
Varição de CIM	0.063-0.25	0.5-16	0.031-0.25	0.031-0.25	0.031-0.25	<0.016-0.25	1-8	
CIM₅₀	0.063	2	0.125	0.063	0.063	0.063	4	
CIM₉₀	0.125	8	0.25	0.125	0.125	0.125	8	
Média geométrica	0.0788	2.0785	0.0994	0.0853	0.0853	0.0651	3.7034	

AMB, anfotericina B; FLC, fluconazol; ITC, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; ISA, isavuconazol; 5FC, flucitosina
 FONTE: o autor

TABELA 3 – Informações clínicas dos pacientes cujos isolados de *Cryptococcus deuterogattii* foram obtidos

Código do isolado	Informações clínicas									
	Gênero	Idade	Ocupação	Estado imunológico	Local de infecção	Tratamento	Desfecho	Cidade	Ano de isolamento	
G3	M	51	Vendedor	IC	SNC/pulmão	AMB (1)/ITC (100)	Falecimento	Curitiba-PR	2002	
G4	M	76	-	-	Pele	-	-	Curitiba-PR	2005	
G6	M	-	-	-	Pulmão	-	-	-	2005	
G8	-	-	-	-	Sangue	-	-	Curitiba-PR	2008	
G10	F	-	-	IC	SNC	-	-	Curitiba-PR	2009	
G11	M	38	Pedreiro	IC	SNC/pulmão	AMB (3)/FLC (400)	Cura/sequela	Pinhais-PR	2009	
G12	M	-	-	-	SNC	-	-	Curitiba-PR	2009	
G13	M	60	Aposentado	IC	SNC	AMB (1)/FLC (400)	Falecimento	Colombo-PR	2010	
G14	M	32	Lenhador	IC	SNC/pulmão	AMB (3)/FLC (800)	Cura/sequela	Almirante Tamandaré-PR	2010	
G15	M	48	Aposentado	HIV	SNC	AMB (1)/FLC (800)	Cura	Curitiba-PR	2011	
G18	F	20	Repositora	IC	SNC/pulmão	ISA (200)	Cura/sequela	Almirante Tamandaré-PR	2012	
G19	F	35	Farmacêutica	IC	SNC/pulmão	ISA (200)	Cura	São José dos Pinhais-PR	2013	
N377	F	45	Diarista	HIV	SNC	AMB (1)/FLC (400)	Falecimento	Curitiba-PR	2006	
UFU303	F	30	Dona de casa	IC	SNC	AMB (1)/FLC (400)	Cura	Uberlândia-MG	2015	
UFU489	F	31	Dona de casa	HIV	SNC	AMB (1)/FLC (400)	Cura	Uberlândia-MG	1999	
UFU675	M	50	-	HIV	SNC	AMB (1)/FLC (400)	Falecimento	Uberlândia-MG	2007	
UFU986	M	55	-	IC	SNC	AMB (1)	Falecimento	Uberlândia-MG	2008	
UFU993	M	72	Agricultor	IC	Sangue/pele	AMB (1)/FLC (400)	Falecimento	Uberlândia-MG	2014	

M: masculino; F: feminino; IC: imunocompetente; HIV: vírus HIV; SNC: sistema nervoso central; AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; ISA: isavuconazol; PR: Paraná; MG: Minas Gerais; - : dados não disponíveis. Doses dos tratamentos: AMB - mg/Kg/dia, FLC, ITC e ISA - mg/dia

FONTE: o autor

Dentre os antifúngicos testados, o isavuconazol apresentou melhor atividade antifúngica contra *C. deuterogattii*, apresentando os menores valores de média geométrica ($0.065 \mu\text{g mL}^{-1}$). Duas pacientes imunocompetentes foram incluídas em uma pesquisa clínica internacional multicêntrica para testar o isavuconazol: VITAL (ClinicalTrials.gov, NCT00634049) (THOMPSON et al., 2016). Uma das pacientes, 20 anos, repositora do setor de hortifrúti em um supermercado, relatou contato constante com madeira, frutas e vegetais durante suas atividades laborais. Após o diagnóstico de criptococose, recebeu terapia com anfotericina B por 16 dias, porém sem resposta terapêutica. Logo em seguida passou a receber isavuconazol e apresentou completa resposta clínica, radiológica e microbiológica após 6 meses de tratamento. Contudo, desenvolveu anosmia como sequela da infecção. A segunda paciente, 35 anos, farmacêutica, sem relato de contato direto com madeira, recebeu isavuconazol como terapia inicial por 176 dias, apresentando completa resposta clínica, sem apresentar sequelas.

Flucitosina apresentou a menor atividade antifúngica “in vitro”, apresentando o maior valor de media geométrica de CIM ($3.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) entre os antifúngicos testados, porém os valores de CIM para todos os isolados estavam dentro dos valores considerados como tipo-selvagem. Isolados não-selvagens à flucitosina são raramente encontrados na clínica (HAGEN et al., 2010; CHEN et al., 2014), mas o uso como monoterapia pode levar a seleção de isolados não-selvagens ao antifúngico (HOSPENTHAL & BENNETT, 1998). Como a flucitosina não é comercializada no Brasil e é utilizada em apenas algumas situações, supõem-se que os pacientes não receberam este antifúngico e, portanto, os isolados de *C. deuterogattii* não foram expostos ao fármaco. Existem estudos na literatura mostrando isolados de *Cryptococcus* spp. com baixa suscetibilidade a flucitosina (ILLNAIT-ZARAGOZÍ et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2011; LOCKHART et al., 2012), inclusive estudos brasileiros observaram valores altos de CIM para flucitosina quando testados contra *Cryptococcus* spp. (MATOS et al., 2012; TRILLES et al., 2012; FAVALESSA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014).

Concluindo, a maioria dos isolados do complexo de espécies *C. gattii* foram obtidos a partir de pacientes imunocompetentes, tendo o SNC como o órgão mais afetado. Todos os isolados foram identificados como *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII) e foram identificados dois novos padrões de AFLP para esta espécie. Todos os isolados apresentaram suscetibilidade aos antifúngicos testados “in vitro”.



FIGURA 2 – Padrões de AFLP apresentados pelos 18 isolados de *C. deuterogattii* (AFLP6V/GII). WM178REF (*C. deuterogattii* AFLP6V/GII) foi utilizado como linhagem referência na análise
 FONTE: o autor

REFERÊNCIAS

- ANZAI, M. C.; LAZÉRA, M. D. S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; DE PAULA, D. A. J.; NAKAZATO, L.; TAKAHARA, D. T.; SIMI, W. B.; HAHN, R. C. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v.57, p.414–418, 2014.
- BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C.; ABELN, E. C.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.147, p.891–907, 2001.
- BYRNES, E. J.; BARTLETT, K. H.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infections**, v.13, p.895–907. 2011.
- CARDOSO, P. H. M.; BARONI, F. DE A.; SILVA, E. G.; NASCIMENTO, D. C.; MARTINS, M. D. A.; SZEZS, W.; PAULA, C. R. Feline nasal granuloma due to *Cryptococcus gattii* type VGII. **Mycopathologia**, v.176, p.303–307, 2013.
- CARRICONDE, F.; GILGADO, F.; ARTHUR, I.; ELLIS, D.; MALIK, R.; VAN DE WIELE, N.; ROBERT, V.; CURRIE, B. J.; MEYER, W. Clonality and α -a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population—an emerging outbreak in Australia. **PLoS ONE**, v.6, e16936, 2011.
- CHEN, S. C-A.; SLAVIN, M. A.; HEATH, C. H.; PLAYFORD, E. G.; BYTH, K.; MARRIOTT, D.; KIDD, S. E.; BAK, N.; CURRIE, B.; HAJKOWICZ, K.; KORMAN, T. M.; MCBRIDE, W. J.; MEYER, W.; MURRAY, R.; SORRELL, T. C.; Australia and New Zealand mycoses interest group (ANZMIG)-*Cryptococcus* Study. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clinical and Infectious Diseases**, v.55, p789–798, 2012.
- CHEN, S. C-A.; KORMAN, T. M.; SLAVIN, M. A.; MARRIOTT, D.; BYTH, K.; BAK, N.; CURRIE, B. J.; HAJKOWICZ, K.; HEATH, C. H.; KIDD, S.; MCBRIDE, W. J.; MEYER, W.; MURRAY, R.; PLAYFORD, E. G.; SORRELL, T. C.; Australia and New Zealand mycoses interest group (ANZMIG) *Cryptococcus* Study. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical and Infectious Diseases**, v.57, p.543–551, 2013.
- CHEN, S. C-A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p.980–1024, 2014.
- CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; SUNDAR, G.; KATHURIA, S.; PRAKASH, A.; KHAN, Z.; SUN, S.; XU, J. *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, p.961–967, 2011.

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; PRAKASH, A.; MEIS, J. F. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Critical Reviews in Microbiology**, v.38, p.1–16, 2012.

CHOWDHARY, A.; PRAKASH, A.; RANDHAWA, H. S.; KATHURIA, S.; HAGEN, F.; KLAASSEN, C. H.; MEIS, J. F. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. **Mycoses**, v.56, p.222–8, 2013.

CICORA, F.; PETRONI, J.; FORMOSA, P.; ROBERTI, J. A rare case of *Cryptococcus gattii* pneumonia in a renal transplant patient. **Transplant Infectious Disease**, v.17, p.463–466, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2008) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard – Third edition*. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 U.S.A.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica** (Cairo) 2013:675213, 2013.

COSTA, S. DO P. S. E.; LAZÉRA, M. DOS S.; SANTOS, W. R. A.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; NISHIKAWA, M. M.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.662–664, 2009.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; BAER, R.; BYRNES, E.; GALANIS, E.; HEITMAN, J.; HOANG, L.; LESLIE, M. J.; MACDOUGALL, L.; MAGILL, S. S.; MORSHED, M. G.; MARR, K. A.; *Cryptococcus gattii* working group of the Pacific Northwest. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.1185–1191, 2009.

DEBOURGOGNE, A.; HAGEN, F.; ELENGA, N.; LONG, L.; BLANCHET, D.; VERON, V.; LORTHOLARY, O.; CARME, B.; AZNAR, C. Successful treatment of *Cryptococcus gattii* neurocryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent child from the French Guiana Amazon region. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.210–213, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; ALLER, A. I.; CANTON, E.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; CHOWDHARY, A.; CORDOBA, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GOVENDER, N.; HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; JOHNSON, E.; KIDD, S.; LASS-FLÖRL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; ST-GERMAIN, G.; TRILLES, L.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans*-

Cryptococcus gattii species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.5898–5906, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; HAGEN, F.; GOVENDER, N.; GUARRO, J.; JOHNSON, E.; LASS-FLÖRL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; TRILLES, L.; KIDD, S.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.3107–3113, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; GONZALEZ, G. M.; GUINEA, J.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; THOMPSON, G. R.; TURNIDGE, J. Multicenter study of isavuconazole MIC distributions and epidemiological cutoff values for the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex using the CLSI M27-A3 broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, p.666–668, 2015.

FAVALESSA, O. C.; DE PAULA, D. A. J.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; TADANO, T.; LAZERA, M. DOS S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; WALDEREZ SZESZS, M.; SILVA, D.; HAHN, R. C. Molecular typing and *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, p.1037–1043, 2014.

FRANCO-PAREDES, C.; WOMACK, T.; BOHLMAYER, T.; SELLERS, B.; HAYS, A.; PATEL, K.; LIZARAZO, J.; LOCKHART, S. R.; SIDDIQUI, W.; MARR, K. A. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **Lancet Infectious Diseases**, v.15, p.348–355, 2015.

FRASER, J. A.; GILES, S. S.; WENINK, E. C.; GEUNES-BOYER, S. G.; WRIGHT, J. R.; DIEZMANN, S.; ALLEN, A.; STAJICH, J. E.; DIETRICH, F. S.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v.27, p.1360–1364, 2005.

GALANIS, E.; MACDOUGALL, L.; KIDD, S.; MORSHED, M.; British Columbia *Cryptococcus gattii* Working Group. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.251–257, 2010.

HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. **Mycopathologia**, v.170, p.209–211, 2010.

HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M-T.; BARTLETT, K. H.; SWINNE, D.; GEERTSEN, E.; KLAASSEN, C. H.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F. *In vitro* antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350

clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.5139–5145. 2010.

HAGEN, F.; COLOM, M. F.; SWINNE, D.; TINTELNOT, K.; IATTA, R.; MONTAGNA, M. T.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; COGLIATI, M.; VELEGRAKI, A.; BURGGRAAF, A.; KAMERMANS, A.; SWEERE, J. M.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H.; BOEKHOUT, T. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, p.1618–1624, 2012.

HAGEN, F.; CERESINI, P. C.; POLACHECK, I.; MA, H.; NIEUWERBURGH, F.; GABALDON, T.; KAGAN, S. E.; PURSALL, R.; HOOGVELD, H. L.; IERSEL, L. J. J.; KLAU, G.W.; KELK, S. M.; STOUGIE, L.; BARTLETT, K. H.; VOELZ, K.; PRYSZCZ, L. P.; CASTAÑEDA, L.; LAZERA, M.; MEYER, W.; DEFORCE, D.; MEIS, J. F.; MAY, R. C.; KLAASSEN, C. H. W.; BOEKHOUT, T. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. **PLoS ONE**, v.8, e71148, 2013.

HAGEN, F.; CHOWDHARY, A.; PRAKASH, A.; YNTEMA, J-B.; MEIS, J. F. Molecular characterization of *Cryptococcus gattii* genotype AFLP6/VGII isolated from woody debris of divi-divi (*Caesalpinia coriaria*), Bonaire, Dutch Caribbean. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, p.193–196, 2014.

HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B.; KOLECKA, A.; POLACHECK, I.; SIONOV, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; LUMBSCH, H. T.; BOEKHOUT, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v.78, p.16–48, 2015.

HEADLEY, S. A.; DI SANTIS, G. W.; DE ALCÂNTARA, B. K.; COSTA, T. C.; DA SILVA, E. O.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; GOMES, L. A.; ALFIERI, A. A.; BRACARENSE, A. P. *Cryptococcus gattii*-induced infections in dogs from Southern Brazil. **Mycopathologia**, v.180, p.265–275, 2015.

HOSPENTHAL, D. R.; BENNETT, J. E. Flucytosine monotherapy for cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.260–264, 1998.

ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F.; FERNÁNDEZ-ANDREU, C. M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; KLAASSEN, C. H. W.; MEIS, J. F. Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. **BMC Infectious Diseases**, v.10, p.1-7, 2010.

ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F.; FERNÁNDEZ-ANDREU, C. M.; PERURENA-LANCHA, M. R.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H. Environmental isolation and characterisation of *Cryptococcus* species from living trees in Havana city, Cuba. **Mycoses**, v.55, e138–44, 2012.

IQBAL, N.; DEBESS, E. E.; WOHRLE, R.; SUN, B.; NETT, R. J.; AHLQUIST, A. M.; CHILLER, T.; LOCKHART, S. R.; *Cryptococcus gattii* public health working group.

Correlation of genotype and *in vitro* susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.539–544, 2010.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.3059–3066, 2002.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **PNAS**, v.7, p.17258–17263, 2004.

KIDD, S. E.; BACH, P. J.; HINGSTON, A. O.; MAK, S.; CHOW, Y.; MACDOUGALL, L.; KRONSTAD, J. W.; BARTLETT, K. H. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.51–57, 2007a.

KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P. J.; CHEN, H.; HINGSTON, A. O.; KRONSTAD, J. W.; BARTLETT, K. H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.1433–43, 2007b.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 2016.

LINARES, C.; COLOM, M. F.; TORREBLANCA, M.; ESTEBAN, V.; ROMERA, Á.; HAGEN, F. Environmental sampling of *Ceratonia siliqua* (carob) trees in Spain reveals the presence of the rare *Cryptococcus gattii* genotype AFLP7/VGIV. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p.269–272, 2015.

LIU, X. Z.; WANG, Q. M.; GÖKER, M.; GROENEWALD, M.; KACHALKIN, A. V.; LUMBSCH, H. T.; MILLANES, A. M.; WEDIN, M.; YURKOV, A. M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F. Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in Mycology**, v.81, p.85–147, 2015.

LIU, X. Z.; WANG, Q. M.; THEELEN, B.; GROENEWALD, M.; BAI, F. Y.; BOEKHOUT, T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Studies in Mycology**, v.81, p.1–26, 2015.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; BOLDEN, C. B.; DEBESS, E. E.; MARSDEN-HAUG, N.; WORHLE, R.; THAKUR, R.; HARRIS, J. R.; *Cryptococcus gattii* PNW public health working group. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and *in vitro* susceptibility. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.73, p.144–8, 2012.

MARQUES, S. A.; BASTAZINI, I.; MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; BARBIERI D'ELIA, M. P.; LASTÓRIA, J. C.; MARQUES, M. E. Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients. **International Journal of Dermatology**, v.51, p.780–784, 2012.

MARTINS, L. M. S.; WANKE, B.; LAZÉRA, M. DOS S.; TRILLES, L.; BARBOSA, G. G.; MACEDO, R. C. L. DE.; CAVALCANTI, M. D. O. A.; EULÁLIO, K. D.; CASTRO, J. A.; SILVA, A. S.; NASCIMENTO, F. F.; GOUVEIA, V. A.; MONTE, S. J. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 106:725–730, 2011.

MATOS, C. S.; DE SOUZA ANDRADE, A.; OLIVEIRA, N. S.; BARROS, T. F. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.31, p.1647–1652, 2012.

NASCIMENTO, E.; BONIFÁCIO DA SILVA, M. E. N.; MARTINEZ, R.; VON ZESKA KRESS, M. R. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus gattii* molecular type VGI in Brazil: a case report and review of literature. **Mycoses**, v.57, p.442–447, 2014.

NYAZIKA, T. K.; HAGEN, F.; MEIS, J.F.; ROBERTSON, V. J. *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIV-infected individuals in Harare, Zimbabwe. **Journal of Infection**, v.72, p.745–752, 2016.

PASA, C. R.; CHANG, M. R.; HANS-FILHO, G. Post-trauma primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host by *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycoses**, v.55, e1–3, 2012.

SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.14–20, 2010.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M. H.; PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, p.291–322, 2010.

SANTOS, W. R. A. DOS.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P. S. E.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M. DO.; MEDEIROS, R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. D. E. C.; MACÊDO, R. C.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. DOS S. Primary endemic Cryptococcosis *gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.813–818, 2008.

SILVA, D. C.; MARTINS, M. A.; SZESZS, M. W.; BONFIETTI, L. X.; MATOS, D.; MELHEM, M. S. C. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. **Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases**, v.72, p.332–339, 2012.

SOUTO, A. C.; BONFIETTI, L. X.; FERREIRA-PAIM, K.; TRILLES, L.; MARTINS, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; PHAM, C. D.; MARTINS, L.; DOS SANTOS, W.; CHANG, M.; BRITO-SANTOS, F.; SANTOS, D. C.; FORTES, S.; LOCKHART, S. R.; WANKE, B.; MELHEM, M. S.; LAZÉRA, M. S.; MEYER, W. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, e0004885, 2016.

THOMPSON, G. R.; RENDON, A.; DOS SANTOS, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; AZIE, N.; MAHER, R.; LEE, M.; KOVANDA, L.; ENGELHARDT, M.; VAZQUEZ, J. A.; CORNELLY, O. A.; PERFECT, J. R. Isavuconazole treatment of cryptococcosis and dimorphic mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, v.63, p.356-362, 2016.

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

TRILLES, L.; MEYER, W.; WANKE, B.; GUARRO, J.; LAZÉRA, M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. **Medical Mycology**, v.50, p.328–332, 2012.

CAPÍTULO IV – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS “IN VITRO” DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS SENSU STRICTO*

HERKERT PF, MEIS JF, LUCCA DE OLIVEIRA SALVADOR G, RODRIGUES GOMES R, APARECIDA VICENTE V, DOMINGUEZ MURO M, LAMEIRA PINHEIRO R, LOPES COLOMBO A, VARGAS SCHWARZBOLD A, SAKUMA DE OLIVEIRA C, SIMÃO FERREIRA M, QUEIROZ-TELLES F, HAGEN F. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans sensu stricto* from southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.67, p.560–569, 2018.

1. RESUMO

A diversidade genética do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* tem sido investigada por diversas técnicas moleculares, como por exemplo, sequenciamento multi-locus, amplificação de fragmento polimórfico (AFLP), polimorfismo de fragmentos de restrição e análise de microssatélite. Este capítulo teve como objetivo, investigar a distribuição dos genótipos de isolados clínicos, ambientais e veterinários de *C. neoformans sensu lato*, assim como a suscetibilidade “in vitro” aos antifúngicos frequentemente utilizados para o tratamento da criptococose. Para este estudo, 219 isolados de *C. neoformans s.l.* foram caracterizados quanto ao “mating-type”, sorotipo, AFLP, microssatélites e suscetibilidade à antifúngicos. Entre os isolados estudados, 136 (69%) foram provenientes de pacientes infectados pelo vírus HIV. Todos os isolados pertencem a espécie *C. neoformans sensu stricto*, são “mating-type” a e sorotipo A. Quanto ao AFLP, os isolados foram divididos em AFLP1/VNI ($n=172$; 78.5%), AFLP1A/VNII ($n=19$; 8.7%), AFLP1B/VNII ($n=4$; 1.8%) e um novo padrão de AFLP para a espécie, nomeado aqui como AFLP1C ($n=23$; 10.5%). Todos os isolados foram suscetíveis aos antifúngicos testados e não foi observado correlação entre genótipo e suscetibilidade. Na análise de microssatélites, a maioria dos isolados clínicos foram agrupados em 1 complexo de microssatélite diferindo entre si em 1 locus. Quatorze isolados ambientais possuem genótipos de microssatélites únicos, porém diferem de isolados clínicos em 1 locus. O índice de diversidade de Simpson para a população estudada foi $D=0.9856$. Em conclusão, a maioria das infecções causadas por isolados de *C. neoformans s.s.* ocorreram em pacientes infectados pelo vírus HIV. O genótipo de AFLP mais frequente foi AFLP1/VNI e todos os isolados foram suscetíveis aos antifúngicos testados. As análises de microssatélites mostraram alta diversidade genética entre a população de *C. neoformans s.s.* estudada, semelhança genética entre isolados ambientais e clínicos, assim como relação geográfica e temporal entre eles.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, criptococose, AFLP, microssatélites, diversidade genética, suscetibilidade.

2. INTRODUÇÃO

Dentre o gênero *Cryptococcus*, os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são os mais importantes em micologia médica, pois são os principais agentes de criptococose (HAGEN et al., 2015). Esta infecção é comum como complicação após transplante de órgãos sólidos, apresentando alta morbidade e mortalidade (27%) durante o primeiro anos pós-transplante (HENAO-MARTÍNEZ & BECKHAM, 2015). Entre pacientes infectados pelo vírus HIV, aproximadamente 223 mil novos casos ocorreram

em 2014 em todo o mundo, e destes, aproximadamente 180 mil mortes foram registradas (RAJASINGHAM et al., 2017).

A diversidade genética de *C. neoformans sensu lato* (*s.l.*) tem sido investigada por diversos métodos moleculares, como análise multilocus (MEYER et al., 2009; BEALE et al., 2015; COGLIATI et al., 2016), AFLP (ARSIC ARSENIJEVIC et al., 2014), RFLP (BRITO-SANTOS et al., 2015) e análise de microssatélites (HAGEN et al., 2012). Baseado em abordagens moleculares *C. neoformans s.s.* é agrupado dentro dos genótipos AFLP1/VNI, AFLP1A/VNII e AFLP1B/VNII, *C. deneoformans* é agrupado no genótipo AFLP2/VNIV e o híbrido entre *C. neoformans s.s.* e *C. deneoformans* é AFLP3/VNIII (BOEKHOUT et al., 2001; BOVERS et al., 2008; HAGEN et al., 2015). E ainda, híbridos inter-espécies foram encontrados entre *C. deneoformans* e *C. gattii* (AFLP2/VNIV × AFLP4/VGI = AFLP8), *C. neoformans s.s.* e *C. gattii* (AFLP1/VNI × AFLP4/VGI = AFLP9) e *C. neoformans* e *C. deuterogattii* (AFLP1/VNI × AFLP6/VGII = AFLP11) (BOVERS et al., 2006; BOVERS et al., 2008; AMINNEJAD et al., 2012).

O genótipo AFLP1/VNI é predominante e representa a maioria das infecções por *Cryptococcus* spp. em todo o mundo (MEYER et al., 2003; COGLIATI, 2013). Já o genótipo AFLP2/VNIV é geograficamente restrito a Europa e América do Norte e o híbrido AFLP3/VNIII é encontrado na Europa e raramente em outras regiões (BOEKHOUT et al., 2001; BOVERS et al., 2008; COGLIATI, 2013). Na América Latina o genótipo AFLP1/VNI é também o mais frequente, mas a distribuição dos outros genótipos é variável de acordo com o país. Colômbia e Brasil têm a mais diversificada população do continente (MEYER et al., 2013; COGLIATI, 2013), ainda, alguns estudos têm demonstrado diferenças nos genótipos circulantes em cada região do Brasil (MATSUMOTO et al., 2007; SOUZA et al., 2010; MATOS et al., 2012). Estas evidências sugerem que estudos moleculares são necessários para elucidar a diversidade genética e a distribuição das espécies entre os diferentes microambientes (CHOWDHARY et al., 2011).

Além das diferenças entre a distribuição geográfica, alguns estudos têm observado diferenças na suscetibilidade antifúngica das espécies. Comparando os genótipos AFLP1 (*C. neoformans s.s.*), AFLP2 (*C. deneoformans*) e AFLP3 (*C. neoformans s.s.* × *C. deneoformans*), o genótipo AFLP1 apresenta menor suscetibilidade à anfotericina B (GUINEA et al., 2010; HAGEN et al., 2012) e ao fluconazol, itraconazol

e flucitosina (CHOWDHARY et al., 2011); AFLP2 é menos suscetível a flucitosina, mas mais suscetível ao fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol (HAGEN et al., 2012).

Considerando estas informações, é necessário enfatizar a importância de investigar as relações epidemiológicas entre isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* spp. bem como a relação com o perfil de suscetibilidade, isto permite o melhor entendimento a respeito do comportamento do fungo como saprófita no ambiente e como patógeno, sugerindo medidas de prevenção e tratamento da criptococose.

Este capítulo teve como objetivo investigar a distribuição dos genótipos e o perfil de suscetibilidade antifúngica de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans s.l.*, bem como a diversidade genética desta população.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS E DADOS CLÍNICOS

Este foi um estudo multicêntrico envolvendo 219 isolados de *C. neoformans s.l.*, previamente identificados com ágar Níger, ágar CGB e tinta Nanquim, provenientes do Laboratório de micologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Hospital Universitário do Oeste do Paraná da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel-PR e Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil. Cento e noventa e sete isolados foram obtidos de amostras clínicas, 19 de amostras ambientais, 2 de origem veterinária e 1 cuja informação de fonte não estava disponível. Os isolados foram coletados e armazenados entre 1987 e 2015. Para a revitalização realizou-se o cultivo de cada isolado em ágar Sabouraud, seguido de incubação por 72 horas à 35°C ± 2. Após o período de incubação, uma única colônia foi transferida para um novo cultivo e utilizada posteriormente nos testes. Para os isolados clínicos, os prontuários médicos dos pacientes foram consultados para o acesso as informações clínicas. Este trabalho foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR, CAAE: 32599414.0.0000.0096.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

3.2.1 Extração de DNA genômico

A quantidade correspondente a, aproximadamente, 1 cm² de cultura foi adicionada em 300 µL de tampão de lise (Roche Diagnostics, Almere, Holanda) seguida de lise mecânica no aparelho MagNA Lyser (Roche Diagnostics) e centrifugação de 2 minutos a 12.000 × *g*, seguido de inativação das células por 10 minutos a 100°C, após esta etapa 200 µL da solução foram usados para a extração automática de DNA usando a plataforma MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics) com eluição final de 100 µL (HAGEN et al., 2016).

3.2.2 *Mating-type*, sorotipagem e genotipagem

O *mating-type* foi determinado através da amplificação parcial do gene *RUM1* conforme descrito anteriormente (ARSIC ARSENIJEVIC et al., 2014). *Cryptococcus neoformans s.l.* 125.91 (=CBS10512; **aA**; AFLP1/VNI), H99 (=CBS8710; **αA**; AFLP1/VNI), JEC20 (=CBS10511; **aD**; AFLP2/VNIV) e JEC21 (=CBS10513; **αD**; AFLP2/VNIV) foram incluídos como controle (ARSIC ARSENIJEVIC et al., 2014). As análises de AFLP foram realizadas de acordo com Hagen e colaboradores (2016). Os dados foram analisados no programa BioNumerics versão 7.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) com coeficiente de correlação de Pearson e algoritmo de agrupamento UPGMA. Os fragmentos de DNA com tamanhos variando entre 20 bp a 600 bp foram incluídos nas análises.

3.2.3 Tipagem de microssatélite

A relação genética entre os isolados de *C. neoformans s.l.* foi investigada usando o painel de nove marcadores de microssatélites descrito por Illnait-Zaragozí e colaboradores (2010). As árvores de abrangência mínima foram calculadas usando o programa BioNumerics versão 7.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) (ILLNAIT-ZARAGOZÍ et al., 2010). O poder discriminatório da tipagem de microssatélite foi calculado com o pacote Haplotype Analysis versão 1.05 (ELIADES & ELIADES, 2009).

3.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS “IN VITRO”

O total de 109 isolados randomicamente escolhidos foram utilizados para os testes de suscetibilidade. O protocolo padrão M27-A3 estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* foi seguido para a realização dos testes (CLSI, 2008). Os antifúngicos selecionados foram anfotericina B (Bristol Myers Squibb, Munique, Alemanha), fluconazol (Pfizer, Sandwich, Reino Unido), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica), voriconazol (Pfizer), posaconazol (Merck, NJ, E.U.A.), isavuconazol (Basilea Pharmaceutica, Basel, Suíça) e flucitosina (ICN Pharmaceuticals, Zoetermeer, Holanda). As concentrações testadas variaram entre 0.016 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol; e 0.062 a 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluconazol e flucitosina. Os isolados de *C. neoformans s.l.* foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas a 30°C e o inóculo foi ajustado para 1×10^3 UFC/mL em salina 0.9%. As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C por 72 horas e a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de reduzir 100% do crescimento fúngico para anfotericina B e capaz de reduzir 50% do crescimento para os outros antifúngicos quando comparados com o controle de crescimento. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como linhagens referência para o controle de qualidade do teste (CLSI, 2008). A interpretação dos valores de CIM foi realizada com base nos valores epidemiológicos de corte (ECV) (ESPINEL-INGROFF et al., 2012a; ESPINEL-INGROFF et al., 2012b; ESPINEL-INGROFF et al., 2015), que estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 – Valores epidemiológicos de corte para definição de *Cryptococcus neoformans sensu stricto* (AFLP1/VNI) tipo-selvagem

Espécie	Antifúngico	ECV (CIM $\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		95% ^a	97.5% ^a	99% ^a
<i>C. neoformans s.s.</i> (AFLP1/VNI)	Anfotericina B	0.5	1	1
	Fluconazol	8	8	16
	Itraconazol	0.25	0.5	0.5
	Posaconazol	0.25	0.25	0.25
	Voriconazol	0.25	0.25	0.5
	Isavuconazol	0.12	0.12	-
	Flucitosina	8	8	16

ECV: valor epidemiológico de corte

^aECV calculado compreendendo 95%, 97.5% ou 99% da população estudada

FONTE: adaptado de Espinel-Ingroff e colaboradores (2012a; 2012b; 2015)

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ foram obtidos pela ordenação dos dados em ordem crescente para cada antifúngico, pela seleção do valor médio e nonagésimo, respectivamente. A média geométrica dos CIMs foi calculada usando o programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, U.S.A.). Quando o valor de CIM foi menor ou maior que as diluições testadas, 1 log₂ menor ou 1 log₂ maior foi utilizado para calcular a média geométrica, respectivamente. Um teste não-paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon bicaudal foi aplicado para comparar os valores de CIM entre os genótipos de *C. neoformans s.l.*. O teste foi realizado pelo StatistiXL software, versão 1.8 (StatistiXL, Nedland, WA, Austrália) e o valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICOS

Entre os isolados clínicos, 136 (69%) foram obtidos de pacientes infectados pelo vírus HIV e 29 (14.7%) de pacientes com outra condição imunossupressora, como

transplante ($n=20$), uso de corticoide ($n=4$) e câncer ($n=2$). Ainda, 7 pacientes (3.6%) não apresentavam condição imunossupressora e para 25 (12.7%) a informação de estado imunológico do paciente não estava disponível. A variação das idades foi de 9-78 anos, com média de 38 anos, sendo que a maioria dos pacientes era do gênero masculino (65%, $n=128$).

4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Entre os 219 isolados, 218 eram sorotipo *A mating-type* α e 1 isolado o fragmento do gene *RUM1* não amplificou e, portanto, permaneceu com sorotipo e *mating-type* indeterminados. A análise de AFLP dividiu os isolados em quatro genótipos de AFLP. A maioria dos isolados foram agrupados com as linhagens referência de *C. neoformans* AFLP1/VNI ($n=172$; 78.5%), sendo portanto pertencentes a espécie *C. neoformans* s.s.. Dezenove (8.7%) isolados pertencem ao subgrupo AFLP1A/VNB/VNII e 4 (1.8%) pertencem ao subgrupo AFLP1B/VNII. Vinte e três (10.5%) isolados foram agrupados em um único cluster AFLP1C, correspondendo a um novo padrão para subgrupo de AFLP (FIGURA 1). Um (0.5%) isolado não amplificou, portanto, permaneceu com AFLP indeterminado.

4.3 TIPAGEM DE MICROSSATÉLITE E DIVERSIDADE GENÉTICA

A combinação dos nove marcadores de microsatélite para os 219 isolados resultou em 129 genótipos, sendo 93 genótipos de microsatélites únicos. Usando o índice de diversidade de Simpson (D), o poder discriminatório da análise para o painel com os nove marcadores foi de 0.9856. Em um único clado de microsatélite 117 isolados foram agrupados, diferindo entre si em 1 dos 9 marcadores (FIGURA 2). Quatorze dos 19 isolados ambientais representam genótipos de microsatélite únicos, porém, diferindo em apenas 1 locus dos isolados clínicos (FIGURA 2). Observou-se que 2 clados menores foram compostos por isolados provenientes, principalmente, de pacientes infectados pelo vírus HIV, contudo, os demais isolados agruparam-se independentemente do fator de risco/doença subjacente do hospedeiro (FIGURA 3). A comparação entre genótipos de

microsatélite e AFLP mostrou que isolados AFLP1A/VNI e AFLP1C estão relacionados, diferindo apenas em 1-4 marcadores. A maioria dos isolados do subgrupo AFLP1A/VNB/VNII sub A estão agrupados e representam isolados ambientais. Da mesma forma, isolados do subgrupo AFLP1A/VNB/VNII sub B estão agrupados, e 8 de 9 são provenientes de pacientes infectados pelo vírus HIV (FIGURA 4). A distribuição temporal dos isolados mostrou a presença do mesmo genótipo por um longo período de tempo, sendo recuperado de amostras clínicas ao longo dos anos 1987 a 2015 (FIGURA 5). A distribuição geográfica mostrou que isolados de diferentes cidades estão relacionados (FIGURA 6), sugerindo a manutenção de um padrão de comportamento e expansão no ambiente.

4.5 SUSCETIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS

Todos os isolados de *C. neoformans* s.s. testados foram suscetíveis aos antifúngicos testados (TABELA 2). Os novos triazóis apresentaram CIM variando entre <0.016 a 0.125 mg L^{-1} para voriconazol e posaconazol, e <0.016 a 0.063 mg L^{-1} para isavuconazol. Para dois isolados AFLP1/VNI, o fluconazol apresentou CIM de 8 mg L^{-1} , considerado tipo-selvagem, porém no limite do valor epidemiológico de corte para AFLP1/VNI. Observou-se também que flucitosina foi o antifúngico menos efetivo, apresentando a maior média geométrica de CIM de 2.42 mg L^{-1} . Não foi observado relação entre genótipo AFLP e suscetibilidade aos antifúngicos testados (teste Mann-Whitney-Wilcoxon's, anfotericina B $p = 0.319$; fluconazol $p = 0.386$; itraconazol $p = 0.548$; voriconazol $p = 0.121$; posaconazol $p = 0.092$; isavuconazol $p = 0.431$; flucitosina $p = 0.191$).

5. DISCUSSÃO

Criptococose causada por *C. neoformans* s.s. no Brasil e em outros países da América Latina está associada, frequentemente, com pacientes diagnosticados com a presença do vírus HIV ou outra condição que debilite o sistema imunológico

(DEBOURGOGNE et al., 2011; DA SILVA et al., 2012; FREIRE et al., 2012; CATTANA et al., 2014; NOGUERA et al., 2015, presente estudo). No Brasil, a frequência de criptococose em pacientes infectados pelo vírus HIV varia entre 58.7 e 97.9% (CASALI et al., 2003; MARTINS et al., 2011; DA SILVA et al., 2012; FREIRE et al., 2012). Por outro lado, a frequência é menor do que a encontrada em outros países da América Latina como Guiana Francesa (67.4%), Argentina (69.2%) e Colômbia (78%) (DEBOURGOGNE et al., 2011; CATTANA et al., 2014; NOGUERA et al., 2015).

Entre os isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* s.s. o *mating-type* α (MAT α) é o mais frequentemente recuperado (HAGEN et al., 2012; COGLIATI, 2013; ELLABIB et al., 2016; HAGEN et al., 2016; presente estudo), esta característica contribui para que esta espécie tenha expansão predominantemente clonal com alguns eventos de recombinação e baixa diversidade genética, o que permite a manutenção de marcadores associados a virulência (LITVINTSEVA & MITCHELL, 2012; DESNOS-OLILVIER et al., 2015). A presença de ambos *mating-types* facilita a reprodução sexuada e a recombinação na população. Contudo, uma população exclusivamente MAT α pode se recombinar devido a capacidade unisexual de reprodução que ocorre entre *Cryptococcus* spp. (SUN et al., 2014). Em regiões específicas, por exemplo Índia, a reprodução unisexual é responsável pela recombinação e fluxo gênico entre a população de *C. neoformans* s.s. (HIREMATH et al., 2008). O MAT α é normalmente encontrado em baixa frequência (FREIRE et al., 2012; HAGEN et al., 2012; HAGEN et al., 2016). Em contrapartida, na África do Sul o MAT α pode ser encontrado em uma frequência de 7.3 a 12% dos isolados clínicos de *C. neoformans* s.s. obtidos de pacientes infectados pelo vírus HIV (LITVINTSEVA et al., 2003; NYAZIKA et al., 2016).

O genótipo AFLP1/VNI é o mais frequente entre *C. neoformans* s.s. em todo o mundo (MEYER et al., 2003; COGLIATI, 2013). No Brasil este genótipo tem sido isolado em uma frequência de 77.5 a 98% (SOUZA et al., 2010; DA SILVA et al., 2012; MATOS et al., 2012), o mesmo foi observado no presente estudo, onde 90% dos isolados de *C. neoformans* s.s. foram AFLP1/VNI. Em outros países da América Latina, como Argentina, Colômbia e México este genótipo também tem alta prevalência (CATTANA et al., 2014; NOGUERA et al., 2015). No Peru, o genótipo AFLP1B/VNII tem sido observado em uma frequência de 34.4% (BEJAR et al., 2015), diferentemente do presente estudo e

de outros estudos brasileiros onde o genótipo AFLP1B/VNII é raramente encontrado (FREIRE et al., 2012; MATOS et al., 2012).

Uma observação interessante deste trabalho, foi a presença de 23 isolados agrupados em um clado de AFLP não descrito anteriormente, representando um novo subgrupo de AFLP, aqui nominado como AFLP1C (FIGURA 1). Ainda, alguns estudos têm relacionado o genótipo com a suscetibilidade aos antifúngicos, onde AFLP1/VNI (*C. neoformans* s.s.) é menos suscetível a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e flucitosina quando comparado com AFLP2/VNIV (*C. deneoformans*) e AFLP3/VNIV (híbrido *C. neoformans* s.s. × *C. deneoformans*) (GUINEA et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2011; HAGEN et al., 2012). Contudo, não foi observado correlação entre genótipo/espécie e suscetibilidade antifúngica entre os isolados estudados, o que pode ser atribuído a presença de genótipos AFLP1 somente.

A tipagem por microssatélites é uma ferramenta de alta resolução para discriminar isolados do complexo *C. neoformans* de diferentes fontes ambientais, permitindo a realização de estudos epidemiológicos (ILLNAIT-ZARAGOZÍ et al., 2010; HAGEN et al., 2012). No presente trabalho, foi observado 1 complexo de microssatélite principal, onde a maioria dos isolados clínicos foram agrupados, porém, com alguns isolados ambientais e veterinários relacionados (FIGURA 2). E ainda, os isolados ambientais de *C. neoformans* s.s. que apresentaram genótipos únicos diferem de isolados clínicos em apenas 1 locus, isto mostra que eles estão geneticamente relacionados. Em um estudo realizado por Illnait-ZaragozÍ e colaboradores (2010) isolados clínicos e ambientais (obtidos a partir de excretas de aves) foram, em sua maioria, agrupados separadamente, sugerindo a presença de nichos ambientais adicionais para *C. neoformans* s.s. capaz de causar infecções em humanos. Contudo, vale ressaltar que no presente trabalho a maior parte dos isolados estudados são de origem clínica e apenas poucos isolados ambientais foram inclusos nas análises. Verificou-se também relação entre os genótipos de microssatélites e AFLP, onde os genótipos de AFLP foram agrupados em diferentes complexos de microssatélites. Os subgrupos AFLP1A/VNB/VNII A e B parecem estar isolados geneticamente, uma vez que ambos foram agrupados em complexos distintos (FIGURA 4). As análises de distribuição temporal e geográfica mostrou que alguns genótipos foram recuperados de amostras

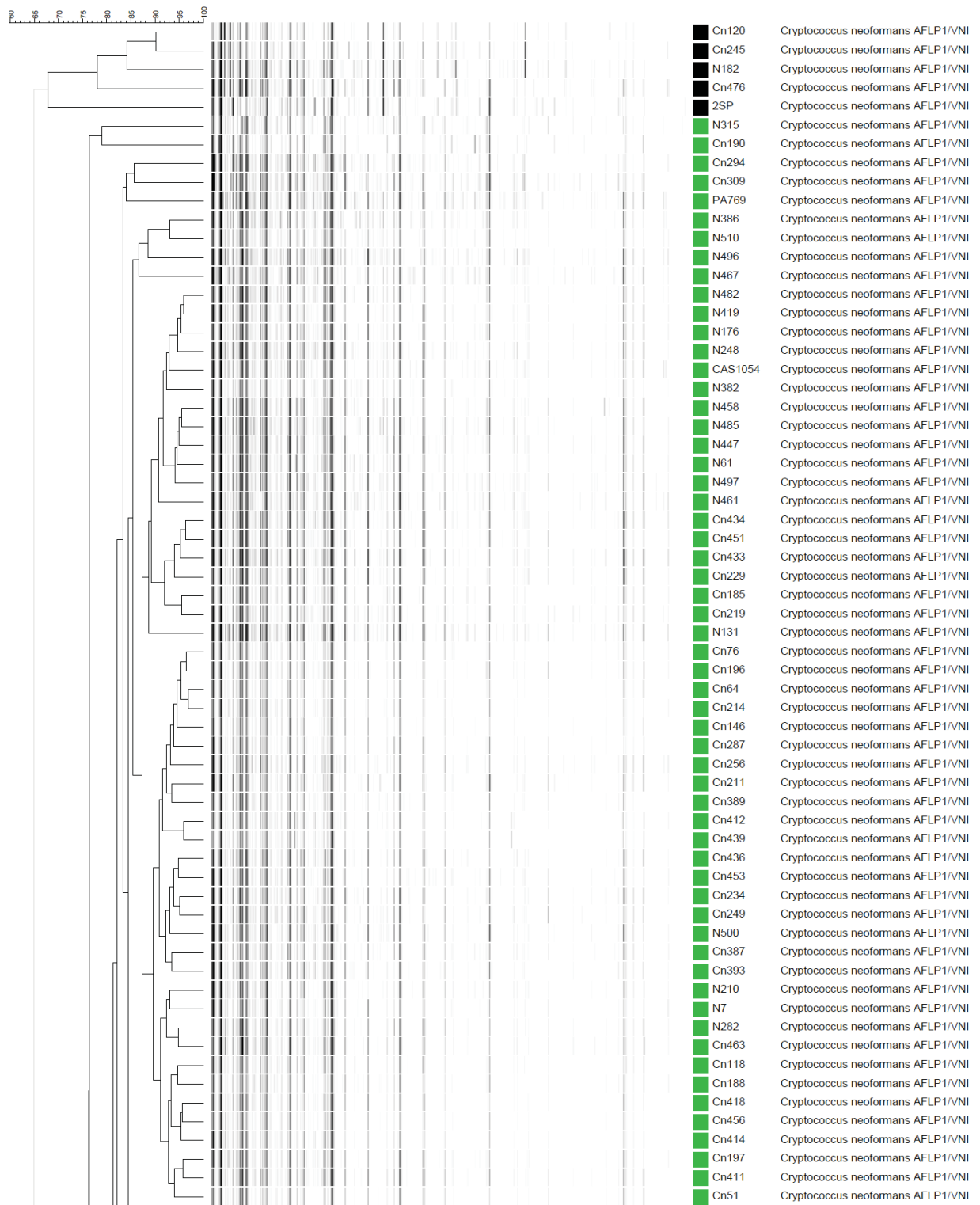
clínicas ao longo das três décadas de estudo e de diferentes regiões geográficas, mostrando sua constante permanência no ambiente (FIGURAS 5 e 6).

A diversidade genética encontrada foi alta, apresentando um valor de diversidade de $D=0.9856$ e a presença de 129 genótipos de microssatélite diferentes entre 219 isolados, sendo 93 genótipos únicos. Contudo, foi inferior ao observado em Cuba ($D=0.993$) e Holanda ($D=0.994$) (ILLNAIT-ZARAGOZÍ et al., 2010; HAGEN et al., 2012). Na Ásia, Pan e colaboradores (2012) encontraram 265 genótipos de microssatélites diferentes entre 493 isolados e diversidade genética variável de acordo com o país. Kuwait e Qatar apresentaram os maiores índices de diversidade ($D=1.000$), seguido de Japão ($D=0.998$), Indonésia ($D=0.994$), Índia ($D=0.983$), China ($D=0.975$) e Tailândia ($D=0.968$). Ainda, os autores observaram relação entre suscetibilidade antifúngica e genótipos de microssatélite (PAN et al., 2012), o que não foi observado no presente trabalho.

Concluindo, a maioria dos casos de criptococose ocorreu em pacientes infectados pelo vírus HIV e foram causados, principalmente, por *C. neoformans* s.s.. O genótipo AFLP1/VNI foi o mais frequente e todos os antifúngicos testados apresentaram atividade “in vitro” contra os isolados. As análises de microssatélite mostraram alta diversidade genética entre a população estudada, semelhança genética entre isolados ambientais, clínicos e veterinários, e a permanência de genótipos de microssatélites em regiões e períodos diferentes.

Cryptococcus Brazil (Pearson/UPGMA)

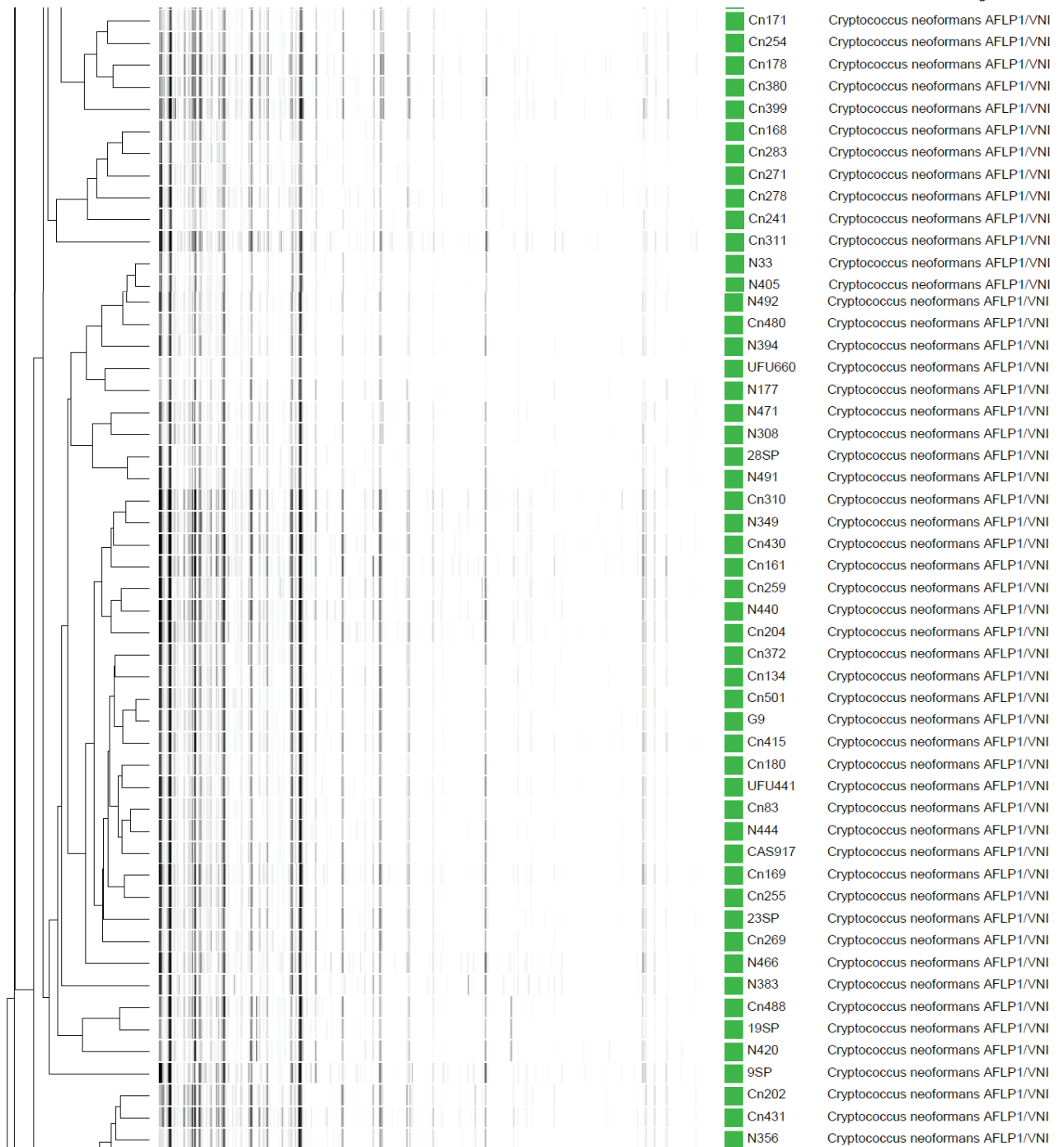
LIZ6006-FAM



Continua

FIGURA 1 – Padrões de AFLP dos 219 isolados de *Cryptococcus neoformans* s.s. verde: AFLP1/VNI; amarelo: AFLP1C/VNI; azul escuro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo I; azul claro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo II; vermelho: AFLP1B/VNII; preto: perfil não atribuído
 FONTE: o autor

Continuação



Continua

FIGURA 1 – Padrões de AFLP dos 219 isolados de *Cryptococcus neoformans* s.s. verde: AFLP1/VNI; amarelo: AFLP1C/VNI; azul escuro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo I; azul claro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo II; vermelho: AFLP1B/VNII; preto: perfil não atribuído
 FONTE: o autor

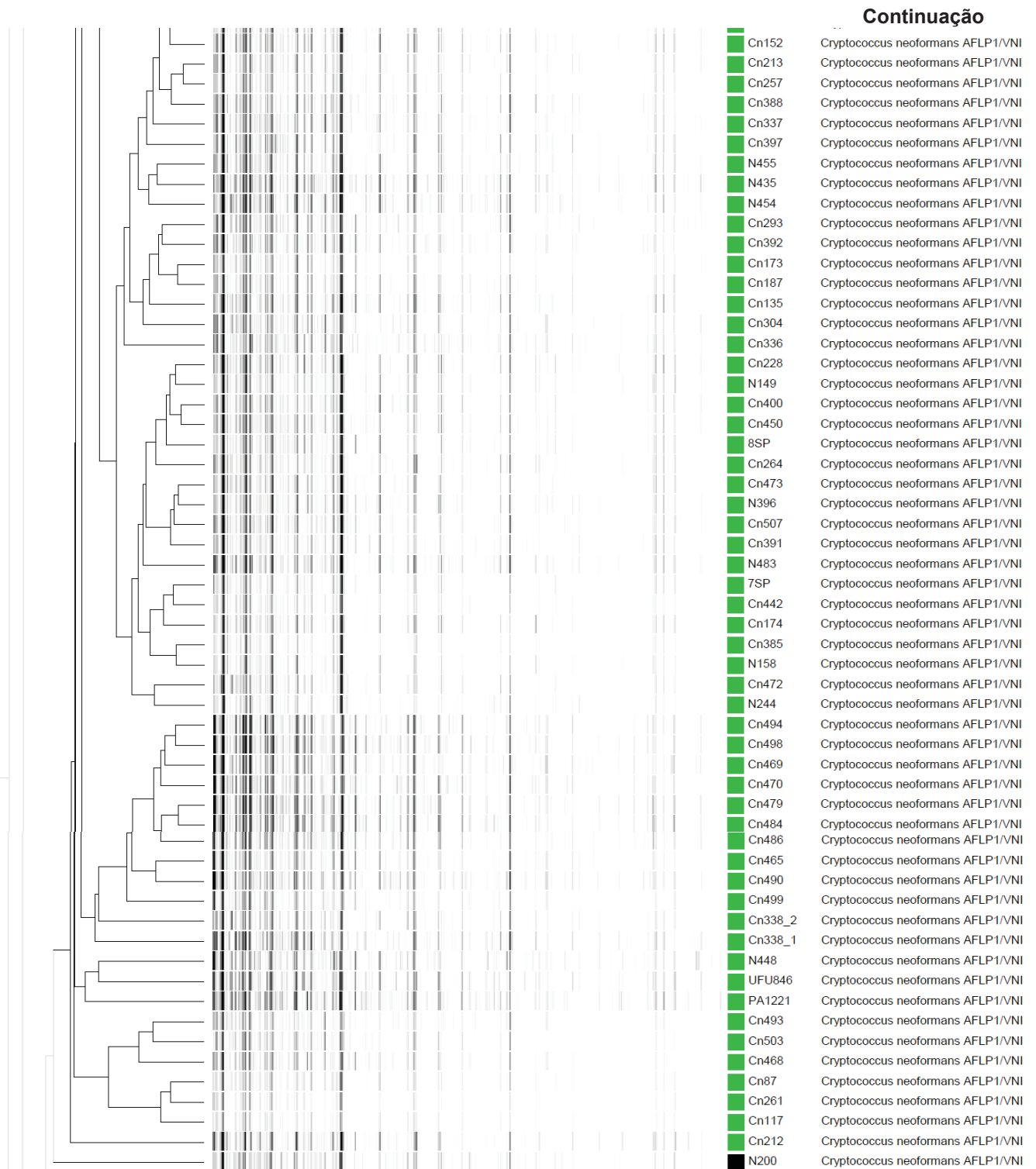


FIGURA 1 – Padrões de AFLP dos 219 isolados de *Cryptococcus neoformans* s.s. verde: AFLP1/VNI; amarelo: AFLP1C/VNI; azul escuro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo I; azul claro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo II; vermelho: AFLP1B/VNII; preto: perfil não atribuído
 FONTE: o autor

Continuação

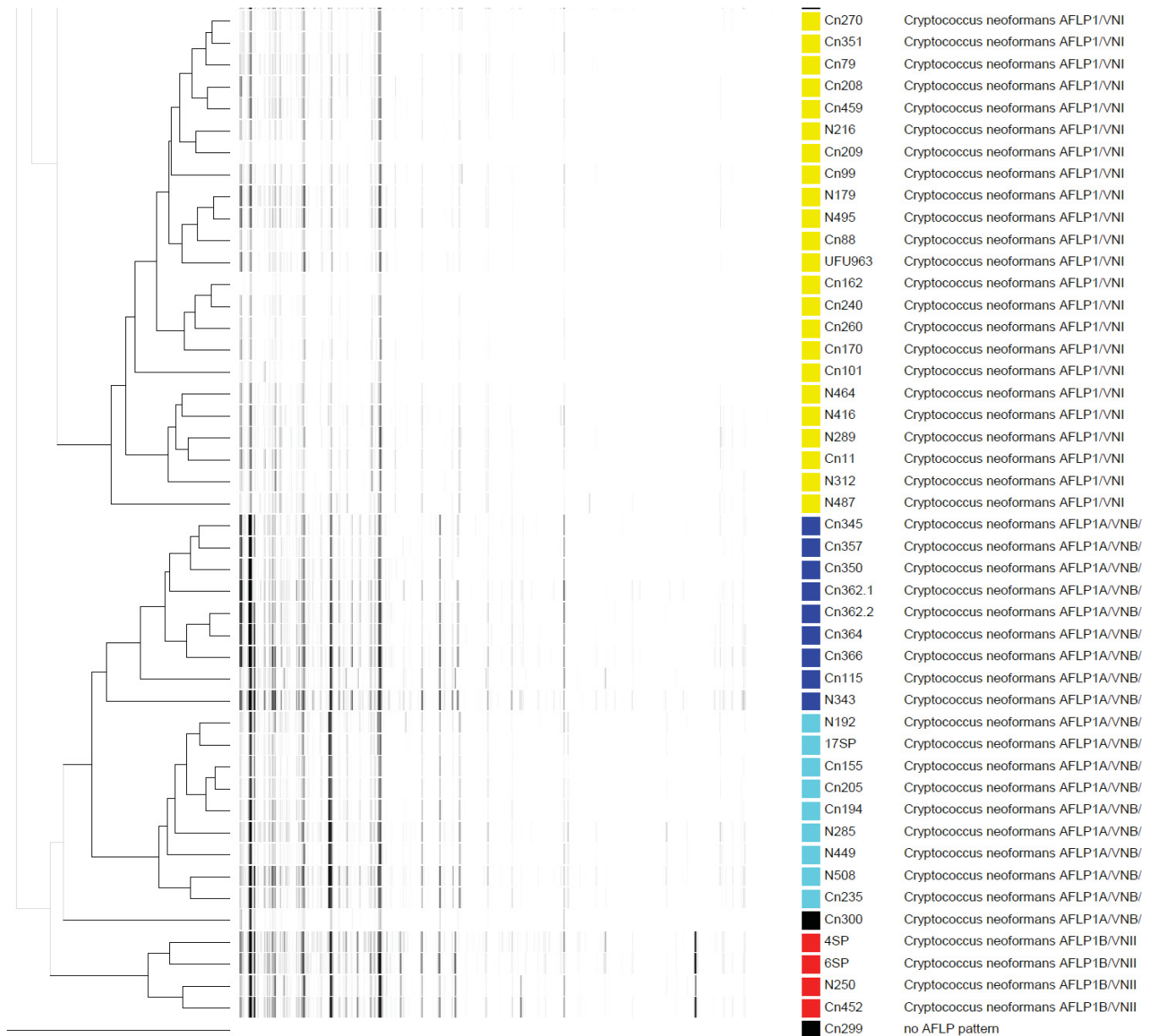


FIGURA 1 – Padrões de AFLP dos 219 isolados de *Cryptococcus neoformans* s.s. verde: AFLP1/VNI; amarelo: AFLP1C/VNI; azul escuro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo A; azul claro: AFLP1A/VNB/VNII subgrupo B; vermelho: AFLP1B/VNII; preto: perfil não atribuído
 FONTE: o autor

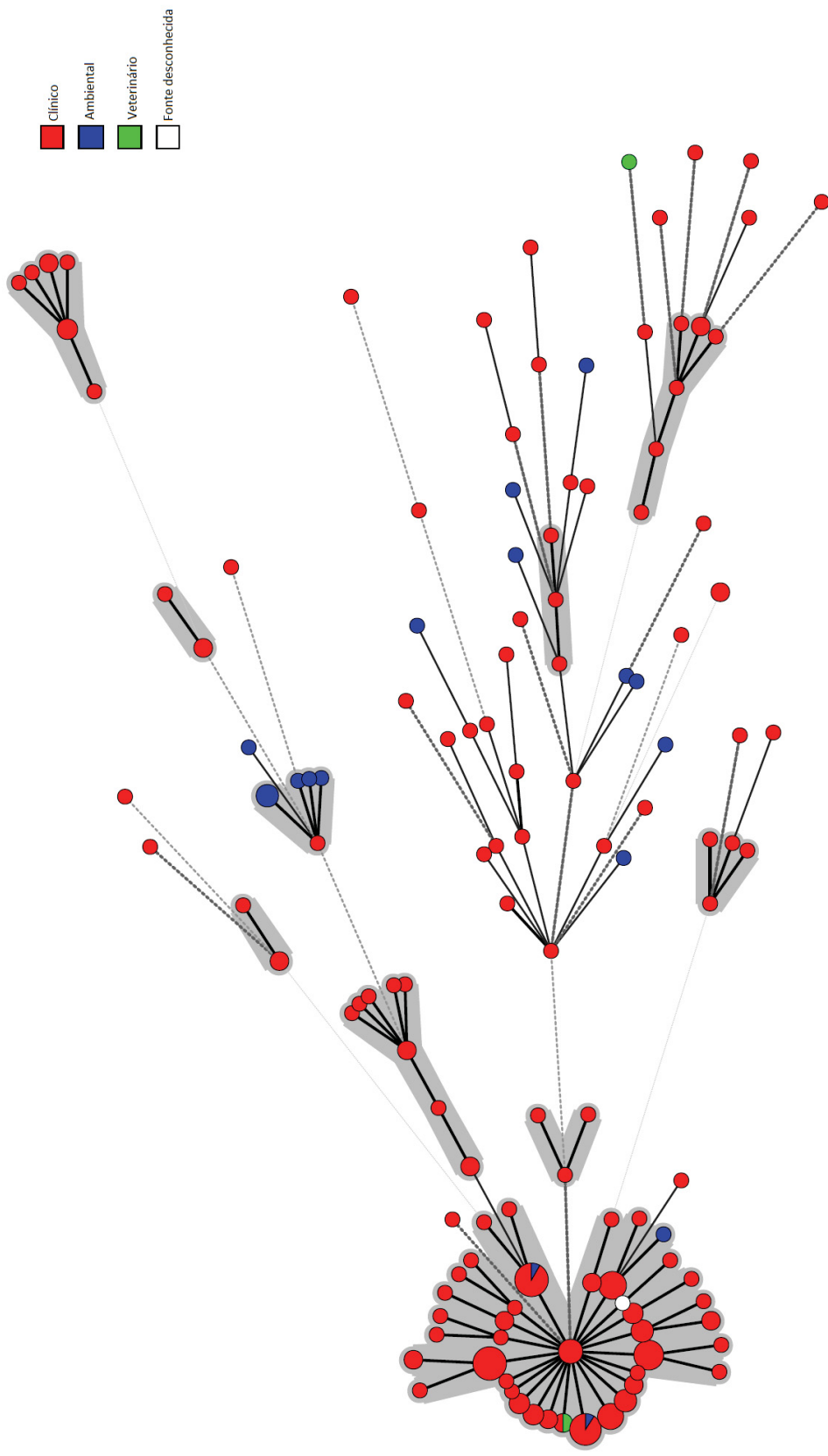


FIGURA 2 – Distribuição de genótipos de microssatélites de acordo com a fonte de isolamento de *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans* s.s.. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreamento cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo a outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha pontilhada: 2-3 loci; linha pontilhada: 4 ou mais loci

FONTE: o autor

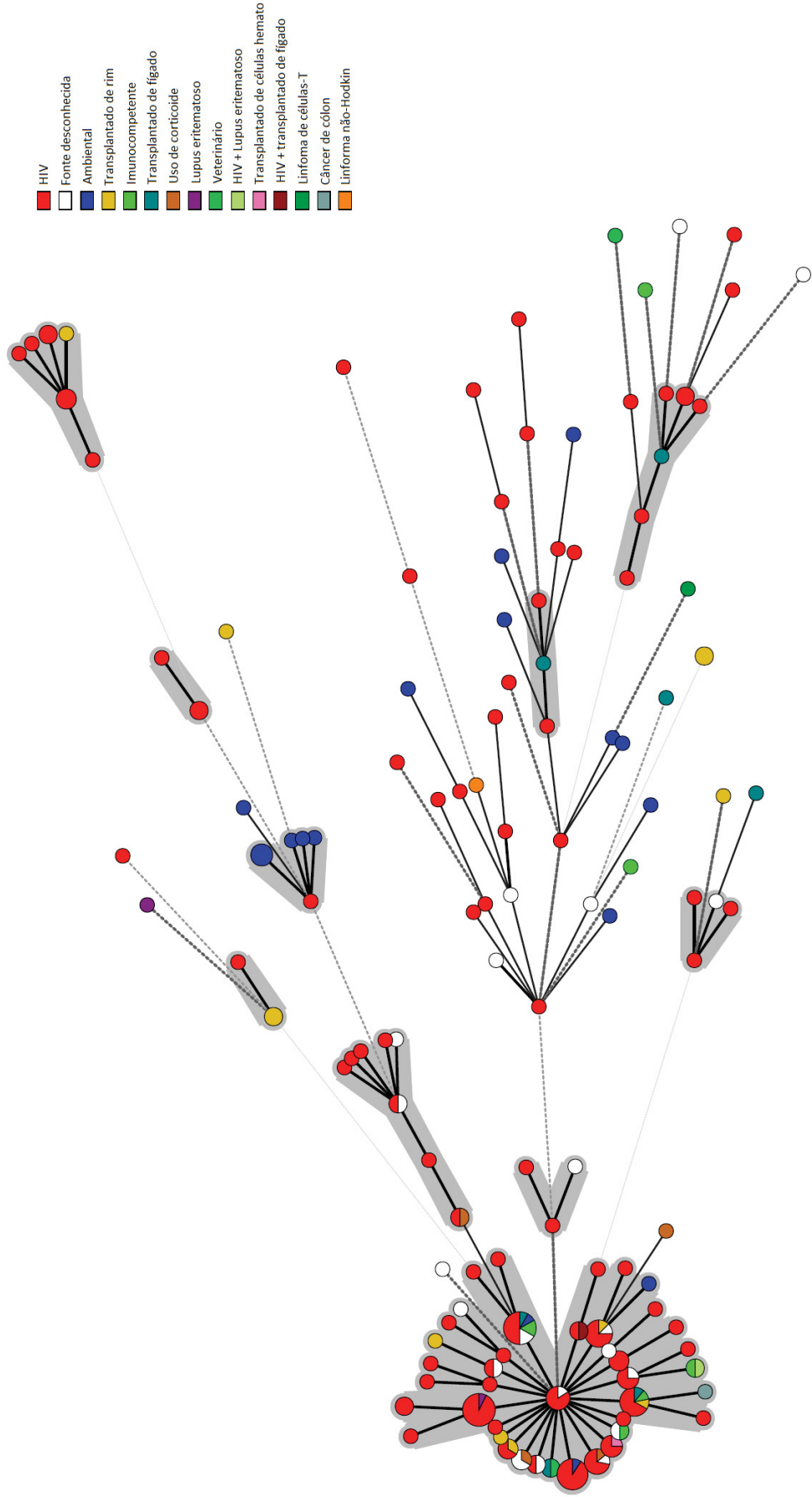


FIGURA 3 – Distribuição de genótipos de microssatélites de *Cryptococcus neoformans sensu stricto* de acordo com os fatores de risco/doença subjacente do paciente. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans* s.s.. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreado cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo ao outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha pontilhada: 2-3 loci; linha cinza: 4 ou mais loci
 FONTE: o autor

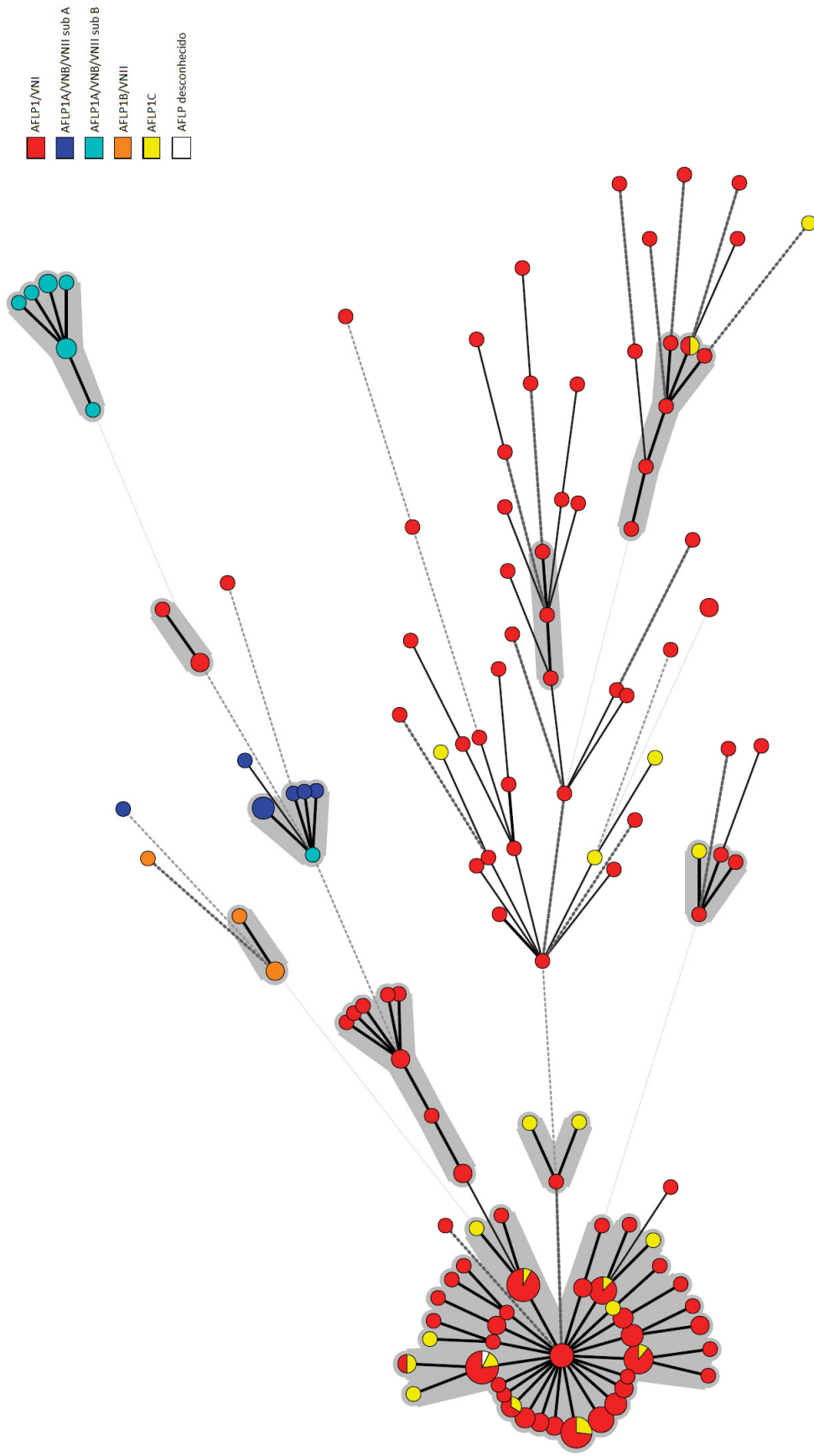


FIGURA 4 – Distribuição de genótipos de microsatélites de *Cryptococcus neoformans sensu stricto* combinado com o genótipo de AFLP. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microsatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans s.s.*. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microsatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreamento cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo a outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha pontilhada: 2-3 loci; linha cinza: 4 ou mais loci
 FONTE: o autor

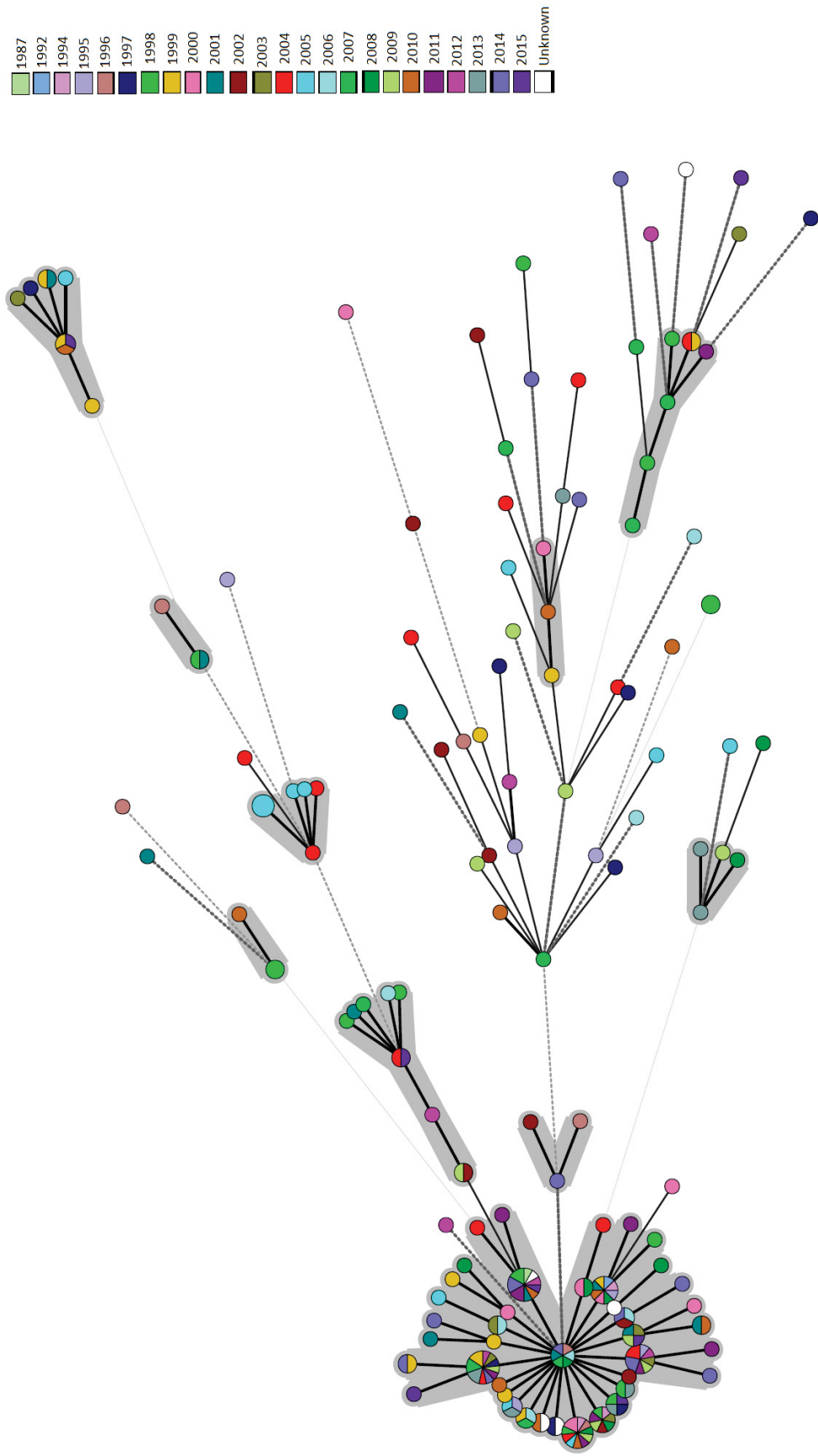


FIGURA 5 – Distribuição de genótipos de microssatélites de acordo com o ano de isolamento de *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans* s.s.. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreamento cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo a outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha pontilhada e cinza: 2-3 loci; linha pontilhada: 4 ou mais loci
 FONTE: o autor

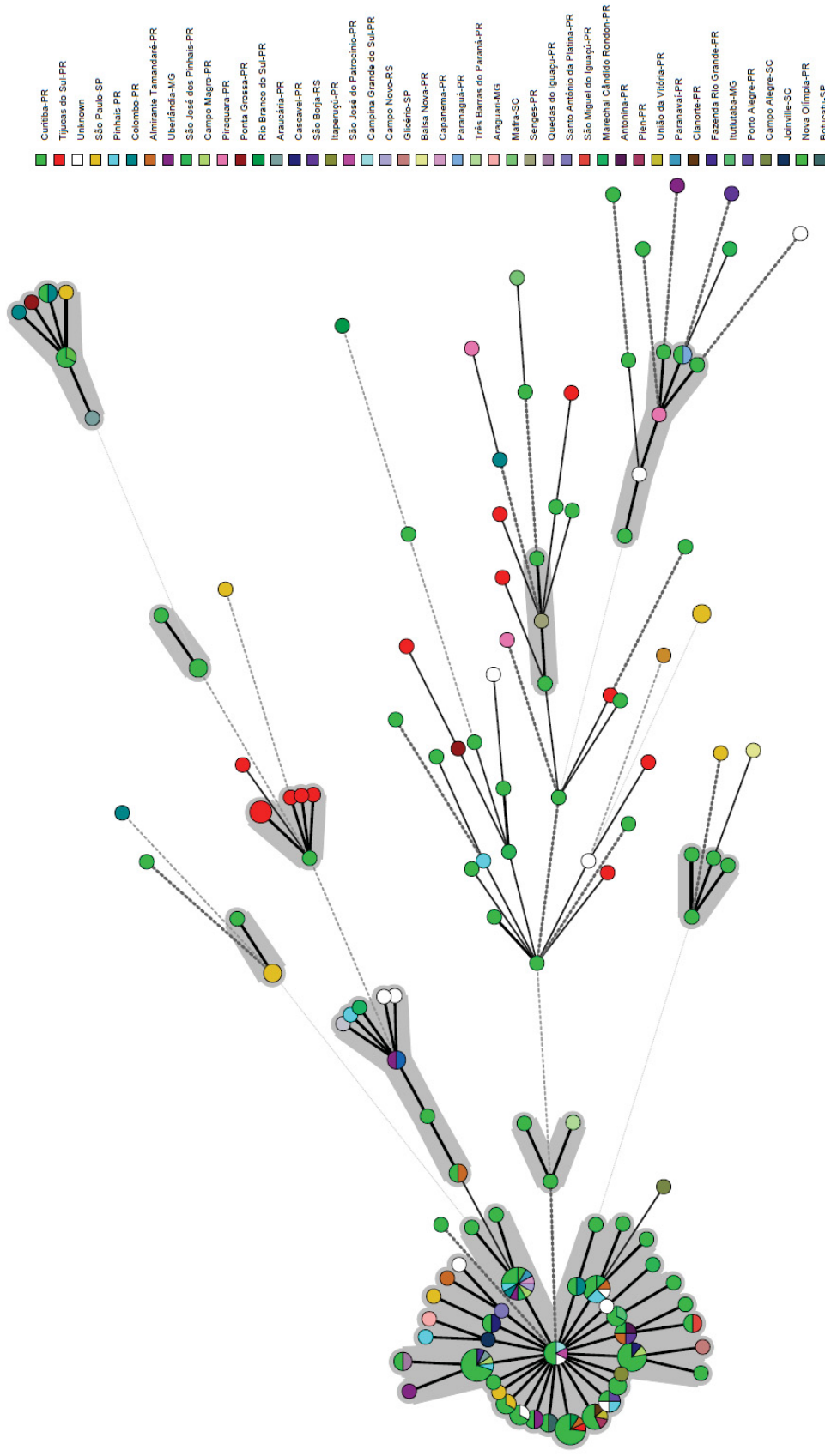


FIGURA 6 – Distribuição de genótipos de microssatélites de acordo com a região de isolamento de *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. Árvore de abrangência mínima baseada em nove marcadores de microssatélites específicos com 219 isolados de *C. neoformans s.s.*. Cada círculo corresponde a um único genótipo de microssatélite e o tamanho corresponde ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo. Os genótipos conectados por sombreamento cinza pertencem ao mesmo clado. As linhas que conectam um genótipo a outro correspondem ao número de marcadores diferentes entre os genótipos. Linha sólida e preta: 1 locus; linha pontilhada e cinza: 2-3 loci; linha pontilhada: 4 ou mais loci
 FONTE: o autor

TABELA 2 - Concentração inibitória mínima dos antifúngicos frente aos isolados de *Cryptococcus neoformans sensu stricto* testados

Espécie	Antifúngico	Valores de CIM (mg L ⁻¹)			
		Variação	CIM ₅₀	CIM ₉₀	MG
<i>C. neoformans</i> s.s. (n=109)	Anfotericina B	<0.016-0.125	0.125	0.125	0.098
	Fluconazol	0.125-8	0.5	0.5	0.516
	Itraconazol	<0.016-0.25	0.031	0.063	0.027
	Voriconazol	<0.016-0.125	0.031	0.031	0.021
	Posaconazol	<0.016-0.125	0.031	0.063	0.027
	Isavuconazol	<0.016-0.063	<0.016	0.031	0.011
	Flucitosina	0.25-8	2	4	2.42

CIM: concentração inibitória mínima; MG, média geométrica; s.s.: *sensu stricto*

FONTE: o autor

REFERÊNCIAS

- AMINNEJAD, M.; DIAZ, M.; ARABATZIS, M.; CASTAÑEDA, E.; LAZERA, M.; VELEGRAKI, A.; MARRIOTT, D.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycopathologia**, v.173, p.337–346, 2012.
- ARSIC ARSENIJEVIC, V.; PEKMEZOVIC, M. G.; MEIS, J. F.; HAGEN, F. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Serbian *Cryptococcus neoformans* isolates. **Mycoses**, v.57, p.380–387, 2014.
- BEALE, M. A.; SABIITI, W.; ROBERTSON, E. J.; FUENTES-CABREJO, K. M.; O'HANLON, S. J.; JARVIS, J. N.; LOYSE, A.; MEINTJES, G.; HARRISON, T. S.; MAY, R. C.; FISHER, M. C.; BICANIC, T. Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, e0003847, 2015.
- BEJAR, V.; TELLO, M.; GARCÍA, R.; GUEVARA, J. M.; GONZALES, S.; VERGARAY, G.; VALENCIA, E.; ABANTO, E.; ORTEGA-LOAYZA, A. G.; HAGEN, F.; GUTIERREZ, E. L. Molecular characterization and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* strains collected from a single institution in Lima, Peru. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p.88–92, 2015.
- BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C.; ABELN, E. C.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.147, p.891–907, 2001.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; DIAZ, M. R.; SPANJAARD, L.; DROMER, F.; HOOGVELD, H. L.; BOEKHOUT, T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.599–607, 2006.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; BOEKHOUT, T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. **Fungal Genetics and Biology**, v.45, p.400–421, 2008.
- BRITO-SANTOS, F.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B.; MEYER, W.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LAZÉRA, M. DOS S. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. **PLoS ONE**, v.10, e0115866. 2015.
- CASALI, A. K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA, L. K.; RIBEIRO, A. M.; AMARAL, A. A.; ALVES, S. H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.405–415, 2003.

CATTANA, M. E.; SOSA, M. DE LÁ.; FERNÁNDEZ, M.; ROJAS, F.; MANGIATERRA, M.; GIUSIANO, G. Native trees of the Northeast Argentine: natural hosts of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, p.188–192, 2014.

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; SUNDAR, G.; KATHURIA, S.; PRAKASH, A.; KHAN, Z.; SUN, S.; XU, J. *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, p.961–967, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2008) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard – Third edition*. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 U.S.A.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica** (Cairo) 2013:675213, 2013.

COGLIATI, M.; ZANI, A.; RICKERTS, V.; MCCORMICK, I.; DESNOS-OLLIVIER, M.; VELEGRAKI, A.; ESCANDON, P.; ICHIKAWA, T.; IKEDA, R.; BIENVENU, A. L.; TINTELNOT, K.; TORE, O.; AKCAGLAR, S.; LOCKHART, S.; TORTORANO, A. M.; VARMA, A. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. **Fungal Genetics and Biology**, v.87, p.22–29, 2016.

DA SILVA, B. K.; FREIRE, A. K.; BENTES, A. D. S.; SAMPAIO, I. D. L.; SANTOS, L. O.; DOS SANTOS, M. S.; DE SOUZA, J. V. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.40–43, 2012.

DEBOURGOGNE, A.; IRIART, X.; BLANCHET, D.; VERON, V.; BOUKHARI, R.; NACHER, M.; CARME, B.; AZNAR, C. Characteristics and specificities of *Cryptococcus* infections in French Guiana, 1998-2008. **Medical Mycology**, v.49, p.864–871, 2011.

DESNOS-OLLIVIER, M.; PATEL, S.; RAOUX-BARBOT, D.; HEITMAN, J.; DROMER, F.; French Cryptococcosis Study Group. Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* Speciation. **MBio**, v.6, e00311, 2015.

ELLABIB, M. S.; ABOSHKIWA, M. A.; HUSIEN, W. M.; D'AMICIS, R.; COGLIATI, M. Isolation, identification and molecular typing of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. **Mycopathologia**, v.181, p.603-608, 2016.

ELIADES, N-G.; ELIADES, D. G. HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany. URL <http://www.uni-goettingen.de/en/134935.html>. 2009.

ESPINEL-INGROFF, A.; ALLER, A. I.; CANTON, E.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; CHOWDHARY, A.; CORDOBA, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GOVENDER, N.; HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; JOHNSON, E.; KIDD, S.; LASS-FLÖRL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; ST-GERMAIN, G.; TRILLES, L.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.5898–5906, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; HAGEN, F.; GOVENDER, N.; GUARRO, J.; JOHNSON, E.; LASS-FLÖRL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; TRILLES, L.; KIDD, S.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.3107–3113, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; GONZALEZ, G. M.; GUINEA, J.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; THOMPSON, G. R.; TURNIDGE, J. Multicenter study of isavuconazole MIC distributions and epidemiological cutoff values for the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex using the CLSI M27-A3 broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, p.666–668, 2015.

FREIRE, A. K. L.; DOS SANTOS BENTES, A.; DE LIMA SAMPAIO, I.; MATSUURA, A. B. J.; OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I.; WANKE, B.; DE SOUZA, J. V. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, v.55, e145-150, 2012.

GUINEA, J.; HAGEN, F.; PELÁEZ, T.; BOEKHOUT, T.; TAHOUNE, H.; TORRES-NARBONA, M.; BOUZA, E. Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain. **Medical Mycology**, v.48, p.942–948, 2010.

HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M-T.; MEIS, J. F.; CHEW, W. H. M.; CURFS-BREUKER, I.; MOUTON, J. W.; HOEPELMAN, A. I.; SPANJAARD, L.; VERWEIJ, P. E.; KAMPINGA, G. A.; KUIJPER, E. J.; BOEKHOUT, T.; KLAASSEN, C. H. Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.1918–1926, 2012.

- HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B.; KOLECKA, A.; POLACHECK, I.; SIONOV, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; LUMBSCH, H. T.; BOEKHOUT, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetic Biology**, v.78, p.16–48, 2015.
- HAGEN, F.; HARE JENSEN, R.; MEIS, J. F.; ARENDRUP, M. C. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato isolates from Denmark. **Mycoses**, v.59, p.576-84, 2016.
- HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; BECKHAM, J. D. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.28, p.300–307, 2015.
- HIREMATH, S. S.; CHOWDHARY, A.; KOWSHIK, T.; RANDHAWA, H. S.; SUN, S.; XU, J. Long-distance dispersal and recombination in environmental populations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from India. **Microbiology**, v.154, p.1513–1524, 2008.
- ILLNAIT-ZARAGOZI, M-T.; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F.; FERNÁNDEZ-ANDREU, C. M.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H. W. Microsatellite typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. **PLoS ONE**, v.5, e9124, 2010.
- LITVINTSEVA, A. P.; MARRA, R. E.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa. **Eukaryotic Cell**, v.2, p.1162–1168, 2003.
- LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G. Population genetic analyses reveal the African origin and strain variation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **PLoS Pathogens**, v.8, e1002495, 2012.
- LIU, X.; WANG, Q.M; GÖKER, M; GROENEWALD, M; KACHALKIN, A.V; LUMBSCH, H.T.; MILLANES, A. M.; WEDIN, M.; YURKOV, A. M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F. Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in Mycology**, v.81, p.85-147, 2015a.
- LIU, X.Z; WANG, Q.M; THEELEN, B; GROENEWALD, M; BAI, F.Y; BOEKHOUT, T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Studies in Mycology**, v.81, p.1-26, 2015b.
- MARTINS, L. M. S.; WANKE, B.; LAZÉRA, M. DOS S.; TRILLES, L.; BARBOSA, G. G.; MACEDO, R. C. L. DE.; CAVALCANTI, M. D. O. A.; EULÁLIO, K. D.; CASTRO, J. A.; SILVA, A. S.; NASCIMENTO, F. F.; GOUVEIA, V. A.; MONTE, S. J. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 106:725–730, 2011.

- MATOS, C. S.; DE SOUZA ANDRADE, A.; OLIVEIRA, N. S.; BARROS, T. F. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.31, p.1647–1652, 2012.
- MATSUMOTO, M. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; BAEZA, L. C.; MELHEM, M. DE S. C.; MEDES-GIANNINI, M. J. S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.49, p.41–47, 2007.
- MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.189–195, 2003.
- MEYER, W.; AANENSEN, D. M.; BOEKHOUT, T.; COGLIATI, M.; DIAZ, M. R.; ESPOSTO, M. C.; FISHER, M.; GILGADO, F.; HAGEN, F.; KAOCHAROEN, S.; LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G.; SIMWAMI, S. P.; TRILLES, L.; VIVIANI, M. A.; KWON-CHUNG, J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v.47, p.561–570, 2009.
- NYAZIKA, T. K.; HAGEN, F.; MACHIRIDZA, T.; KUTEPA, M.; MASANGANISE, F.; HENDRICKX, M.; BOEKHOUT, T.; MAGOMBEI-MAJINJIWA, T.; SIZIBA, N.; CHIN'OMBE, N.; MATEVEKE, K.; MEIS, J. F.; ROBERTSON, V. J. *Cryptococcus neoformans* population diversity and clinical outcomes of HIV-associated cryptococcal meningitis patients in Zimbabwe. **Journal of Medical Microbiology**, v.65, p.1281-1288, 2016.
- NOGUERA, M. C.; ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. Cryptococcosis in Atlántico, Colombia: an approximation of the prevalence of this mycosis and the distribution of the etiological agent in the environment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, p.580–586, 2015.
- PAN, W.; KHAYHAN, K.; HAGEN, F.; WAHYUNINGSIH, R.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; IKEDA, R.; TAJ-ALDEEN, S. J.; KHAN, Z.; IMRAN, D.; SJAM, R.; SRIBUREE, P.; LIAO, W.; CHAICUMPAR, K.; INGVIYA, N.; MOUTON, J. W.; CURFS-BREUKER, I.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H. Resistance of Asian *Cryptococcus neoformans* serotype A is confined to few microsatellite genotypes. **PLoS ONE**, v.7, e32868, 2012.
- RAJASINGHAM, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N.; GOVENDER, N. P.; CHILLER, T. M.; DENNING, D. W.; LOYSE, A.; BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v.17, p.873-81, 2017.

SOUZA, L. K. H.; SOUZA JUNIOR, A. H.; COSTA, C. R.; FAGANELLO, J.; VAINSTEIN, M. H.; CHAGAS, A. L. B.; SOUZA, A. C.; SILVA, M. R. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v.53, p.62–67, 2010.

SUN, S.; BILLMYRE, R. B.; MIECZKOWSKI, P. A.; HEITMAN, J. Unisexual reproduction drives meiotic recombination and phenotypic and karyotypic plasticity in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genetics**, v.10, e1004849, 2014.

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos epidemiológicos permitiram conhecer os reservatórios ambientais de *Cryptococcus* e as espécies relacionadas mais frequentemente com criptococose em humanos. Nichos como excretas de aves, cascas de árvores, madeira em decomposição e solo, são os principais reservatórios ambientais das espécies dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, que representam os principais agentes etiológicos da criptococose (DEBOURGOGNE et al., 2012; ELLABIB et al., 2016; VANHOVE et al., 2016; COGLIATI et al., 2016). A distribuição clínica e ambiental das espécies de *Cryptococcus* spp. varia geograficamente (COGLIATI, 2013), estando isto relacionado com o microclima da região ou, até mesmo com a ausência de estudos epidemiológicos que visam isolar o fungo do ambiente e com a falta de diagnóstico clínico em países em desenvolvimento.

No capítulo II foi relatado o isolamento ambiental de *Cryptococcus* spp. no município de Curitiba-PR. Os nichos ambientais identificados como positivos para *Cryptococcus* spp. foram excretas de aves, solo, madeira em decomposição, casca de árvores dos gêneros *Acer* sp., *Anadenanthera* sp., *Tipuana* sp., *Schinus* sp. e *Ficcus* sp., e estruturas de madeira encontradas nos parques da cidade. O estudo resultou no isolamento das espécies *C. terrestris*, *C. albidus* e *C. laurentii*, com uma frequência de isolamento de 3.7%. *Cryptococcus laurentii* foi a espécie mais isolada a partir do ambiente, principalmente de estruturas de madeira localizadas nos parques, como brinquedos de criança, bancos, floreiras e cercados de madeira. Estes são objetos que estão em constante contato com a população e desta forma representam uma importante fonte de infecção para humanos. Além disso, ressalta-se que cascas de árvores dos gêneros *Anadenanthera* sp., *Tipuana* sp., *Acer* sp. e *Schinus* sp. foram positivas para a presença de *C. laurentii* e também representam nichos ambientais importantes deste fungo, pois estas árvores estão distribuídas amplamente pelos parques e pela cidade de Curitiba-PR. No Brasil, as espécies de *Cryptococcus* predominantes entre amostras ambientais e clínicas são *C. deuterogattii* e *C. neoformans* s.s., sendo que a primeira prevalece na região norte e a segunda na região sul (TRILLES et al., 2008), porém outras espécies também podem infectar humanos e causar criptococose, por exemplo,

C. laurentii e *C. albidus* (MOLINA-LEYVA et al., 2012; HUANG et al., 2015), isolados neste estudo. A hipótese de que *C. neoformans s.l.* e *C. gattii s.l.* dividem o mesmo nicho ambiental não pôde ser provada devido a ausência de isolamento ambiental de espécies destes complexos, porém, pode-se concluir que *C. laurentii* também pode ser encontrado em nichos comumente associados aos complexos de espécies supracitados.

No estudo relatado no capítulo III, foram encontrados isolados de *C. deuterogattii* pertencentes aos *mating-types* α e α . Isto indica que eventos de recombinação gerados por reprodução sexuada entre isolados do ambiente podem estar ocorrendo e sendo responsáveis pela diversidade genética encontrada entre *C. deuterogattii* no Brasil (HAGEN et al., 2013; SOUTO et al., 2016). Observou-se também que 1 isolado clínico de *C. deuterogattii* é geneticamente indistinguível da linhagem de genótipo AFLP6/VGIIa responsável pelos surtos de criptococose em humanos e animais que ocorreram no Canadá. Isto está de acordo com a hipótese da origem da linhagem AFLP6/VGIIa no norte e nordeste do Brasil e sua posterior dispersão para outras regiões do país e para o mundo (HAGEN et al., 2013; SOUTO et al., 2016). Outro achado interessante foi a presença de isolados de *C. deuterogattii* agrupados em dois clados distintos, representando dois novos genótipos de AFLP, que agrupam isolados de regiões diferentes e de ambos os *mating-types* (α e α). A comparação entre a diversidade genética de isolados clínicos e ambientais de *C. deuterogattii* não pôde ser investigada, uma vez que no isolamento ambiental não se obteve isolados desta espécie.

No capítulo IV, observou-se alta diversidade genética entre os isolados de *C. neoformans s.s.* Pela análise de microssatélites pode-se concluir que a maioria dos isolados clínicos de *C. neoformans s.s.* compartilham o mesmo genótipo, uma vez que estão agrupados em 1 complexo de microssatélite principal e diferem entre si em apenas 1 locus. Observou-se também que isolados ambientais compartilham alguns genótipos de microssatélites com isolados clínicos e, mesmo aqueles isolados ambientais que possuem genótipos únicos, diferem dos isolados clínicos em apenas 1 locus. Isto apoia a hipótese inicial de que isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans s.s.* são geneticamente relacionados. Esta relação entre isolados clínicos e ambientais também foi observada na população de *C. neoformans s.s.* encontrada no Japão e Tailândia (PAN et al., 2012). Isto é importante do ponto de vista epidemiológico, pois em Cuba, por

exemplo, isolados clínicos e ambientais são agrupados, em sua maioria, separadamente em análises de microssatélites indicando nichos ambientais diferentes (ILLNAIT-ZARAGOZÍ et al., 2010). Ainda, no presente estudo, observou-se que alguns genótipos de microssatélite em *C. neoformans* s.s. foram isolados ao longo das três décadas envolvidas no estudo e de regiões geográficas diferentes, sugerindo a permanência destes genótipos no ambiente por longos períodos.

A avaliação da suscetibilidade a antifúngicos mostra que os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam suscetibilidade variada “in vitro”, com CIMs maiores para as espécies do complexo *C. gattii* quando comparadas com o complexo *C. neoformans* (ESPINEL-INGROFF et al., 2012; ESPINEL-INGROFF et al., 2015; GUTCH et al., 2015). E ainda, diferenças na suscetibilidade já foram observadas dentro dos dois complexos, onde *C. deuterogattii* (AFLP6/VGII) e *C. neoformans* s.s. (AFLP1/VNI) apresentam suscetibilidade diminuída aos azólicos (HAGEN et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2011; TRILLES et al., 2012) quando comparados com as outras espécies dos complexos. Entretanto, nos testes de suscetibilidade “in vitro” realizados nos estudos dos capítulos III e IV, observou-se que os isolados das espécies *C. deuterogattii* e *C. neoformans* s.s. são tipo-selvagem a todos os antifúngicos testados. A suscetibilidade “in vitro” muitas vezes não reflete a resposta ao tratamento “in vivo”, por isso a terapia para criptococose é escolhida de acordo com as manifestações clínicas e estado geral do paciente, ao invés de considerar a espécie de *Cryptococcus* envolvida na infecção (PERFECT et al., 2010).

Estudos epidemiológicos se fazem importantes como sentinelas para o aparecimento de novos genótipos e/ou espécies circulantes no meio ambiente e que são responsáveis por novos casos de criptococose em determinada região. Assim como a investigação epidemiológica de espécies circulantes, a determinação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos, permite a detecção de possíveis isolados com suscetibilidade diminuída aos antifúngicos utilizados frequentemente no tratamento de criptococose, e isso pode auxiliar na escolha da melhor terapia nesses casos especiais.

É neste contexto, que o presente trabalho vem a acrescentar informações sobre a epidemiologia de *Cryptococcus* spp. da região sul, com dados compatíveis ao que é observado no Brasil, como prevalência de *C. neoformans* s.s. e *C. deuterogattii* entre

isolados clínicos, e suscetibilidade dos mesmos aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol e flucitosina, utilizados para o tratamento da criptococose. Além disso, mostra a diversidade genética encontrada dentro das populações estudadas com a presença de genótipos de AFLP novos para *C. neoformans s.s.* e *C. deuterogattii*, até então não descritos na literatura. Pelas análises de microsatélite verificou-se que isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans s.s.* são geneticamente semelhantes, e que alguns genótipos foram isolados de amostras clínicas em diferentes períodos e de diferentes regiões geográficas, mostrando um padrão de distribuição destes genótipos no ambiente. O isolamento ambiental identificou diferentes nichos para *C. laurentii*, destacando principalmente as estruturas de madeira encontradas nos parques da cidade de Curitiba-PR como, por exemplo, brinquedos dos parquinhos de criança, floreiras, cercados e bancos de madeira, representando nichos ambientais que estão em amplo contato com a população e podem servir como fonte de infecção para humanos.

REFERÊNCIAS

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; SUNDAR, G.; KATHURIA, S.; PRAKASH, A.; KHAN, Z.; SUN, S.; XU, J. *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, p.961–967, 2011.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, 675213 p.1–23, 2013.

COGLIATI, M.; D'AMICIS, R.; ZANI, A.; MONTAGNA, M. T.; CAGGIANO, G.; DE GIGLIO, O.; BALBINO, S.; DE DONNO, A.; SERIO, F.; SUSEVER, S.; ERGIN, C.; VELEGRAKI, A.; ELLABIB, M. S.; NARDONI, S.; MACCI, C.; OLIVERI, S.; TROVATO, L.; DIPINETO, L.; RICKERTS, V.; MCCORMICK-SMITH, I.; AKCAGLAR, S.; TORE, O.; MLINARIC-MISSONI, E.; BERTOUT, S.; MALLIÉ, M.; MARTINS, M. DA L.; VENCÀ, A. C. F.; VIEIRA, M. L.; SAMPAIO, A. C.; PEREIRA, C.; GRISEO, G.; ROMEO, O.; RANQUE, S.; AL-YASIRI, M. H. Y.; KAYA, M.; CERIKCIOGLU, N.; MARCHESE, A.; VEZZULLI, L.; ILKIT, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; PASQUALE, V.; KOREM, M.; POLACHECK, I.; SCOPA, A.; MEYER, W.; FERREIRA-PAIM, K.; HAGEN, F.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; LOCKHART, S. R.; TINTELNOT, K.; TORTORANO, A. M.; DROMER, F.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J.; INÁCIO, J.; ALONSO, B.; COLOM, M. F. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. **FEMS Yeast Research**, v.16, fow045, 2016.

DEBOURGOGNE, A.; HAGEN, F.; ELENGA, N.; LONG, L.; BLANCHET, D.; VERON, V.; LORTHOLARY, O.; CARME, B.; AZNAR, C. Successful treatment of *Cryptococcus gattii* neurocryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent child from the French Guiana Amazon region. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.210–213, 2012.

ELLABIB, M. S.; ABOSHKIWA, M. A.; HUSIEN, W. M.; D'AMICIS, R.; COGLIATI, M. Isolation, identification and molecular typing of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. **Mycopathologia**, v.181, p.603-608, 2016.

ESPINEL-INGROFF, A.; ALLER, A. I.; CANTON, E.; CASTANON-OLIVARES, L. R.; CHOWDHARY, A.; CORDOBA, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GOVENDER, N.; HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; JOHNSON, E.; KIDD, S.; LASS-FLORL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; ST-GERMAIN, G.; TRILLES, L.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.5898–5906, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; GONZALEZ, G. M.; GUINEA, J.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; THOMPSON, G. R.; TURNIDGE, J. Multicenter study of isavuconazole MIC distributions and epidemiological cutoff values for the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex using the CLSI M27-A3 broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, p.666–668, 2015.

GUTCH, R. S.; NAWANGE, S. R.; SINGH, S. M.; YADU, R.; TIWARI, A.; GUMASTA, R.; KAVISHWAR, A. Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, p.1125–1133, 2015.

HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M.-T.; BARTLETT, K. H.; SWINNE, D.; GEERTSEN, E.; KLAASSEN, C. H. W.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.5139–5145, 2010.

HAGEN, F.; CERESINI, P. C.; POLACHECK, I.; MA, H.; NIEUWERBURGH, F.; GABALDON, T.; KAGAN, S. E.; PURSALL, R.; HOOGVELD, H. L.; IERSEL, L. J. J.; KLAU, G.W.; KELK, S. M.; STOUGIE, L.; BARTLETT, K. H.; VOELZ, K.; PRYSZCZ, L. P.; CASTAÑEDA, L.; LAZERA, M.; MEYER, W.; DEFORCE, D.; MEIS, J. F.; MAY, R. C.; KLAASSEN, C. H. W.; BOEKHOUT, T. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. **PLoS ONE**, v.8, e71148, 2013.

HUANG, Y-H.; LIN, I-H.; CHANG, T-C.; TSENG, S-H. Early diagnosis and successful treatment of *Cryptococcus albidus* keratitis: a case report and literature review. **Medicine**, v.94, e885, 2015.

ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F.; FERNÁNDEZ-ANDREU, C. M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; KLAASSEN, C. H. W.; MEIS, J. F. Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. **BMC Infectious Diseases**, v.10, p.1-7, 2010.

MOLINA-LEYVA, A.; RUIZ-CARRASCOSA, J.C.; LEYVA-GARCIA, A.; HUSEIN-ELAHMED, H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. **International Journal of Infectious Diseases**, v.17, e1232–e1233, 2012.

PAN, W.; KHAYHAN, K.; HAGEN, F.; WAHYUNINGSIH, R.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; IKEDA, R.; TAJ-ALDEEN, S. J.; KHAN, Z.; IMRAN, D.; SJAM, R.; SRIBUREE, P.; LIAO, W.; CHAICUMPAR, K.; INGVIA, N.; MOUTON, J. W.; CURFS-BREUKER, I.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H. Resistance of Asian *Cryptococcus neoformans* serotype A is confined to few microsatellite genotypes. **PLoS ONE**, v. 7, e32868, 2012.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.;

PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, p.291–322, 2010.

SOUTO, A. C.; BONFIETTI, L. X.; FERREIRA-PAIM, K.; TRILLES, L.; MARTINS, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; PHAM, C. D.; MARTINS, L.; DOS SANTOS, W.; CHANG, M.; BRITO-SANTOS, F.; SANTOS, D. C.; FORTES, S.; LOCKHART, S. R.; WANKE, B.; MELHEM, M. S.; LAZÉRA, M. S.; MEYER, W. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, e0004885, 2016.

TRILLES, L.; MEYER, W.; WANKE, B.; GUARRO, J.; LAZÉRA, M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. **Medical Mycology**, v.50, p.328–332, 2012.

VANHOVE, M.; BEALE, M. A.; RHODES, J.; CHANDA, D.; LAKHI, S.; KWENDA, G.; MOLLOY, S.; KARUNAHARAN, N.; STONE, N.; HARRISON, T. S.; BICANIC, T.; FISHER, M. C. Genomic epidemiology of *Cryptococcus* yeasts identifies adaptation to environmental niches underpinning infection across an African HIV/AIDS cohort. **Molecular Ecology**, v.26, p.1991-2005, 2016.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. DOS S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.455-562, 2008.

CAPÍTULO VI – LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. CARVALHO, V. O.; VICENTE, V. A.; WERNER, B.; GOMES, R. R.; FORNARI, G.; **HERKERT, P. F.**; RODRIGUES, C. O.; ABAGGE, K. T.; ROBL, R.; CAMIÑA, R. H. Onychomycosis by *Fusarium oxysporum* probably acquired in utero. *Medical Mycology Case Reports*, v.6, p.58-61, 2014.
2. **HERKERT, P. F.**; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; FORNARI, G.; VICENTE, V. A.; QUEIROZ-TELLES, F. In vitro susceptibility and molecular characterization of *Candida* spp. from candidemic patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p.221-228, 2015.
3. FORNARI, G.; VICENTE, V. A.; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; FERRARI, C.; **HERKERT, P. F.**; TAKIMURA, M.; CARVALHO, N. S.; QUEIROZ-TELLES, F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, p.373-380, 2016.
4. NYAZIKA, T. K.; **HERKERT, P. F.**; HAGEN, F.; MATEVEKE, K.; ROBERTSON, V. J.; MEIS, J. F. In vitro antifungal susceptibility profiles of *Cryptococcus* species isolated from HIV-associated cryptococcal meningitis patients in Zimbabwe. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.86, p.289-292, 2016.
5. **HERKERT, P. F.**; HAGEN, F.; DE OLIVEIRA SALVADOR, G. L.; GOMES, R. R.; FERREIRA, M. S.; VICENTE, V. A.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; MEIS, J. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.35, p.1803-1810, 2016.
6. HAGEN, F.; LUMBSCH, H. T.; ARSIC ARSENIJEVIC, V.; BADALI, H.; BERTOUT, S.; BILLMYRE, R. B.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J.; CARBIA, M.; CHAKRABARTI, A.; CHATURVEDI, S.; CHATURVEDI, V.; CHEN, M.; CHOWDHARY, A.; COLOM, M-F.; CORNELLY, O. A.; CROUS, P. W.; CUÉTARA, M. S.; DIAZ, M. R.; ESPINEL-INGROFF, A.; FAKHIM, H.; FALK, R.; FANG, W.; HERKERT, P. F.; FERRER RODRÍGUEZ, C.; FRASER, J. A.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; IDNURM, A.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M-T.; KHAN, Z.; KHAYHAN, K.; KOLECKA, A.; KURTZMAN, C. P.; LAGROU, K.; LIAO, W.; LINARES, C.; MEIS, J. F.; NIELSEN, K.; NYAZIKA, T. K.; PAN, W.; PEKMEZOVIC, M.; POLACHEK, I.; POSTERARO, B.; DE QUEIROZ TELLES, F.; ROMEO, O.; SÁNCHEZ, M.; SAMPAIO, A.; SANGUINETTI, M.; SRIBUREE, P.; SUGITA, T.; TAJ-ALDEEN, S. J.; TAKASHIMA, M.; TAYLOR, J. W.; THEELEN, B.; TOMAZIN, R.; VERWEIJ, P. E.; WAHYUNINGSIH, R.; WANG, P.; BOEKHOUT, T. Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* Genus. **mSphere**, v.2, e00238-17, 2017.

7. **HERKERT, P. F.**; HAGEN, F.; PINHEIRO, R. L.; MURO, M. D.; MEIS, J. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in developing countries. **Journal of Fungi**, v.3, 2017.
8. BRENDA, G. L.; TUON, F. F.; MEIS, J. F.; **HERKERT, P. F.**; HAGEN, F.; DE OLIVEIRA L. Z.; DE CARVALHO DIAS, V.; DA CUNHA, C. A.; QUEIROZ-TELLES, F. Breakthrough candidemia after the introduction of broad spectrum antifungal agents: A 5-year retrospective study. **Medical Mycology**, v.56, p.406–415, 2018.
9. **HERKERT, P. F.**; DOS SANTOS, J. C.; HAGEN, F.; RIBEIRO-DIAS, F.; QUEIROZ-TELLES, F.; NETEA, M. G.; MEIS, J. F.; JOOSTEN, L. A. B. Differential in vitro cytokine induction by the species of *Cryptococcus gattii* complex. **Infection and Immunity**, v.86, e00958-17, 2018.
10. **HERKERT, P. F.**; MEIS, J. F.; DE OLIVEIRA SALVADOR, G. L.; GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; COLOMBO, A. L.; SCHWARZBOLD A. V.; DE OLIVEIRA, C.; FERREIRA, M. S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAGEN, F. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans sensu stricto* from southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.67, p.560–569, 2018.

LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS

- ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a Southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v.161, p.83–91, 2006.
- ALBUQUERQUE, P.; NICOLA, A.M.; NIEVES, E.; PAES, H.C.; WILLIAMSON, P.R.; SILVA-PEREIRA, I.; CASADEVALL, A. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v.5, e00986-13, 2013.
- ALVAREZ, C.; BARBOSA, C.G.; OLIVEIRA, R.V.C.; MORALES, B.P.; WANKE, B.; LAZÉRA, M.S. Techniques for the detection of pathogenic *Cryptococcus* species in wood decay substrata and the evaluation of viability in stored samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, p.126-129, 2013.
- ALVES, G. S. B.; FREIRE, A. K. L.; BENTES, A. DOS S.; PINHEIRO, J. F. DE S.; DE SOUZA, J. V. B.; WANKE, B.; MATSUURA, T.; JACKISCH-MATSUURA, A. B. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v.59, p.509–515, 2016.
- AMINNEJAD, M.; DIAZ, M.; ARABATZIS, M.; CASTAÑEDA, E.; LAZERA, M.; VELEGRAKI, A.; MARRIOTT, D.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycopathologia**, v.173, p.337–346, 2012.
- ANDRADE-SILVA, L.; FERREIRA-PAIM, F.; MORA, D. J.; SILVA, P. R.; ANDRADE, A. A.; ARAUJO, N. E.; PEDROSA, A. L.; SILVA-VERGARA, M. L. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v.51, p.635-640, 2013.
- ANTACHOPOULOS, C.; WALSH, T.J. Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p.126-133, 2012.
- ANZAI, M. C.; LAZÉRA, M. DOS S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; DE PAULA, D. A.; NAKAZATO, L.; TAKAHARA, D. T.; SIMI, W. B.; HAHN, R. C. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v.57, p.414-418, 2014.
- ARAÚJO, G. S.; FONSECA, F. L.; PONTES, B.; TORRES, A.; CORDERO, R. J. B.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; CASADEVALL, A.; VIANA, N. B.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; GARCIA, E. S.; SOUZA, W.; FRASES, S. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS ONE**, v.7, e29561, 2012.
- ARSIC ARSENIJEVIC, V.; PEKMEZOVIC, M. G.; MEIS, J. F.; HAGEN, F. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Serbian *Cryptococcus neoformans* isolates. **Mycoses**, v.57, p.380–387, 2014.

BALTAZAR, L.M.; RIBEIRO, M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.41, p.449-453, 2008.

BARONI, F.A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.G.; OLIVEIRA, M.T.B.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.48, p.71-75, 2006.

BEALE, M. A.; SABIITI, W.; ROBERTSON, E. J.; FUENTES-CABREJO, K. M.; O'HANLON, S. J.; JARVIS, J. N.; LOYSE, A.; MEINTJES, G.; HARRISON, T. S.; MAY, R. C.; FISHER, M. C.; BICANIC, T. Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, e0003847, 2015.

BEJAR, V.; TELLO, M.; GARCÍA, R.; GUEVARA, J. M.; GONZALES, S.; VERGARAY, G.; VALENCIA, E.; ABANTO, E.; ORTEGA-LOAYZA, A. G.; HAGEN, F.; GUTIERREZ, E. L. Molecular characterization and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* strains collected from a single institution in Lima, Peru. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p.88–92, 2015.

BICANIC, T.; HARRISON, T.S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v.72, p.99–118, 2005.

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

BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; DIAZ, M. R.; SPANJAARD, L.; DROMER, F.; HOOGVELD, H. L.; BOEKHOUT, T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.599–607, 2006.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E. E.; BOEKHOUT, T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. **Fungal Genetics and Biology**, v.45, p.400–421, 2008.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, p.S4-S12, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e Epidemiológica da Criptococose**. Brasília, DF. 2012. 18p.

BRITO-SANTOS, F.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B.; MEYER, W.; MEYER, W.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LAZÉRA, M. DOS S.

Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. **PLoS ONE**, v.10, e0115866, 2015.

BUCHANAN, K.L.; MURPHY, J.W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.73-83, 1998.

BYRNES, E. J.; BARTLETT, K. H.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infection**, v.13, p.895–907, 2011.

CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2348-2350, 2001.

CARDOSO, P. H. M.; BARONI, F. DE A.; SILVA, E. G.; NASCIMENTO, D. C.; MARTINS, M. D. A.; SZEZS, W.; PAULA, C. R. Feline nasal granuloma due to *Cryptococcus gattii* type VGII. **Mycopathologia**, v.176, p.303–307, 2013.

CARRICONDE, F.; GILGADO, F.; ARTHUR, I.; ELLIS, D.; MALIK, R.; VAN DE WIELE, N.; ROBERT, V.; CURRIE, B. J.; MEYER, W. Clonality and α -a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population-an emerging outbreak in Australia. **PLoS ONE**, v.6, e16936, 2011.

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

CATTANA, M. E.; SOSA, M. DE LÁ.; FERNÁNDEZ, M.; ROJAS, F.; MANGIATERRA, M.; GIUSIANO, G. Native trees of the Northeast Argentina: natural hosts of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, p.188–192, 2014.

CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, M. J.; MILLER, G. F.; PARE, D. R.; DAM, T.; PAUL-SATYASEE, M.; KIM, K. S.; KWON-CHUNG, K. J. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection & Immunity**, v.72, p.4985–4995, 2004.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends in Microbiology**, v.19, p.564-71, 2011.

CHEN, Y. C.; CHANG S. C.; SHIH, C. C.; HUNG, C. C.; LUHBD, K. T.; PAN, Y. S.; HSIEH, W. C. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of

Cryptococcus neoformans in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.36, p.175-183, 2000.

CHEN, SC-A.; SLAVIN, M. A.; HEATH, C. H.; PLAYFORD, E. G.; BYTH, K.; MARRIOTT, D.; KIDD, S. E.; BAK, N.; CURRIE, B.; HAJKOWICZ, K.; KORMAN, T. M.; MCBRIDE, W. J. H.; MEYER, W.; MURRAY, R.; SORRELL, T. C.; on behalf of the Australia and New Zealand Mycoses Interest Group (ANZMIG)-*Cryptococcus* Study. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clinical and Infectious Diseases**, v.55, p.789–798, 2012.

CHEN, S. C-A.; KORMAN, T. M.; SLAVIN, M. A.; MARRIOTT, D.; BYTH, K.; BAK, N.; CURRIE, B. J.; HAJKOWICZ, K.; HEATH, C. H.; KIDD, S.; MCBRIDE, W. J.; MEYER, W.; MURRAY, R.; PLAYFORD, E. G.; SORRELL, T. C.; Australia and New Zealand mycoses interest group (ANZMIG) *Cryptococcus* Study. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical and Infectious Diseases**, v.57, p.543–551, 2013.

CHEN, S. C-A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p.980–1024, 2014.

CHEN, Y.; LITVINTSEVA, A. P.; FRAZZITTA, A. E.; HAVERKAMP, M. R.; WANG, L.; FANG, C.; MUTHOGA, C.; MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Comparative analyses of clinical and environmental populations of *Cryptococcus neoformans* in Botswana. **Molecular Ecology**, v.24, p.3559–3571, 2015.

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; SUNDAR, G.; KATHURIA, S.; PRAKASH, A.; KHAN, Z.; SUN, S.; XU, J. *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, p.961–967, 2011.

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; PRAKASH, A.; MEIS, J. F. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: An update. **Critical Reviews in Microbiology**, v.38, p.1–16, 2012.

CHOWDHARY, A.; PRAKASH, A.; RANDHAWA, H. S.; KATHURIA, S.; HAGEN, F.; KLAASSEN, C. H.; MEIS, J. F. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. **Mycoses**, v.56, p.222–8, 2013.

CHUN, C.D.; MADHANI, H.D. Applying genetics and molecular biology to the study of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Methods Enzymology**, v.470, p.797–831, 2010.

CICHON, M. **Suscetibilidade a drogas antifúngicas de isolados ambientais de *Cryptococcus neoformans*, procedentes da cidade de Curitiba e região metropolitana, Paraná, Brasil.** Paraná, 2006. 38 f. Dissertação (Mestrado em

Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CICORA, F.; PETRONI, J.; FORMOSA, P.; ROBERTI, J. A rare case of *Cryptococcus gattii* pneumonia in a renal transplant patient. **Transplant Infectious Disease**, v.17, p.463–466, 2015.

CLEVELAND, K.O.; GELFAND, M.S.; RAO, V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to *Cryptococcus albidus* in a liver transplant recipient, **QJM: An International Journal of Medicine**, v.106, p.361–362, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2008) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard – Third edition*. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 U.S.A.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, 675213 p.1–23, 2013.

COGLIATI, M.; D'AMICIS, R.; ZANI, A.; MONTAGNA, M. T.; CAGGIANO, G.; DE GIGLIO, O.; BALBINO, S.; DE DONNO, A.; SERIO, F.; SUSEVER, S.; ERGIN, C.; VELEGRAKI, A.; ELLABIB, M. S.; NARDONI, S.; MACCI, C.; OLIVERI, S.; TROVATO, L.; DIPINETO, L.; RICKERTS, V.; MCCORMICK-SMITH, I.; AKCAGLAR, S.; TORE, O.; MLINARIC-MISSONI, E.; BERTOUT, S.; MALLIÉ, M.; MARTINS, M. DA L.; VENCÀ, A. C. F.; VIEIRA, M. L.; SAMPAIO, A. C.; PEREIRA, C.; GRISEO, G.; ROMEO, O.; RANQUE, S.; AL-YASIRI, M. H. Y.; KAYA, M.; CERIKCIOGLU, N.; MARCHESE, A.; VEZZULLI, L.; ILKIT, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; PASQUALE, V.; KOREM, M.; POLACHEK, I.; SCOPA, A.; MEYER, W.; FERREIRA-PAIM, K.; HAGEN, F.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; LOCKHART, S. R.; TINTELNOT, K.; TORTORANO, A. M.; DROMER, F.; VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J.; INÁCIO, J.; ALONSO, B.; COLOM, M. F. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. **FEMS Yeast Research**, v.16, fow045, 2016.

COGLIATI, M.; ZANI, A.; RICKERTS, V.; MCCORMICK, I.; DESNOS-OLLIVIER, M.; VELEGRAKI, A.; ESCANDON, P.; ICHIKAWA, T.; IKEDA, R.; BIENVENU, A. L.; TINTELNOT, K.; TORE, O.; AKCAGLAR, S.; LOCKHART, S.; TORTORANO, A. M.; VARMA, A. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. **Fungal Genetics and Biology**, v.87, p.22–29, 2016.

COSTA, S.P.S.E.; LAZÉRA, M. S.; SANTOS, W. R. A.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; NISHIKAWA, M. M.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from ambient sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.662-664, 2009.

- DANNAOUI, E.; ABDUL, M.; ARPIN, M.; MICHEL-NGUYEN, A.; PIENS, M.A.; 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.2464-2470, 2006.
- DANESI, P.; FIRACATIVE, C.; COGLIATI, M.; OTRANTO, D.; CAPELLI, G.; MEYER, W. Multilocus sequence typing (MLST) and M13 PCR fingerprinting revealed heterogeneity amongst *Cryptococcus* species obtained from Italian veterinary isolates. **FEMS Yeast Research**, v.14, p.897-909, 2014.
- DA SILVA, B. K.; FREIRE, A. K.; BENTES, A. D. S.; SAMPAIO, I. D. L.; SANTOS, L. O.; DOS SANTOS, M. S.; DE SOUZA, J. V. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.40-43, 2012.
- DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; BAER, R.; BYRNES, E.; GALANIS, E.; HEITMAN, J.; HOANG, L.; LESLIE, M. J.; MACDOUGALL, L.; MAGILL, S. S.; MORSHED, M. G.; MARR, K. A.; *Cryptococcus gattii* working group of the Pacific Northwest. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.8, p.1185-1191, 2009.
- DEBOURGOGNE, A.; IRIART, X.; BLANCHET, D.; VERON, V.; BOUKHARI, R.; NACHER, M.; CARME, B.; AZNAR, C. Characteristics and specificities of *Cryptococcus* infections in French Guiana, 1998-2008. **Medical Mycology**, v.49, p.864-871, 2011.
- DEBOURGOGNE, A.; HAGEN, F.; ELENGA, N.; LONG, L.; BLANCHET, D.; VERON, V.; LORTHOLARY, O.; CARME, B.; AZNAR, C. Successful treatment of *Cryptococcus gattii* neurocryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent child from the French Guiana Amazon region. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.29, p.210-213, 2012.
- DESNOS-OLLIVIER, M.; PATEL, S.; RAOUX-BARBOT, D.; HEITMAN, J.; DROMER, F.; French Cryptococcosis Study Group. Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* Speciation. **MBio**, v.6, e00311, 2015.
- EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.93, p.931-940, 2012.
- ELLABIB, M. S.; ABOSHKIWA, M. A.; HUSIEN, W. M.; D'AMICIS, R.; COGLIATI, M. Isolation, identification and molecular typing of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. **Mycopathologia**, v.181, p.603-608, 2016.
- ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.1642-1644, 1990.

ELIADES, N-G.; ELIADES, D. G. HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany. URL <http://www.uni-goettingen.de/en/134935.html>. 2009.

ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. Long-term survival of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in stored environmental samples from Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p.197–199, 2015.

ESPINEL-INGROFF, A.; ALLER, A. I.; CANTON, E.; CASTANON-OLIVARES, L. R.; CHOWDHARY, A.; CORDOBA, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GOVENDER, N.; HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M. T.; JOHNSON, E.; KIDD, S.; LASS-FLORL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; ST-GERMAIN, G.; TRILLES, L.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.5898–5906, 2012a.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; HAGEN, F.; GOVENDER, N.; GUARRO, J.; JOHNSON, E.; LASS-FLÖRL, C.; LOCKHART, S. R.; MARTINS, M. A.; MEIS, J. F.; MELHEM, M. S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PFALLER, M. A.; SCHELL, W. A.; TRILLES, L.; KIDD, S.; TURNIDGE, J. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.3107–3113, 2012b.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; GONZALEZ, G. M.; GUINEA, J.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; THOMPSON, G. R.; TURNIDGE, J. Multicenter study of isavuconazole MIC distributions and epidemiological cutoff values for the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex using the CLSI M27-A3 broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, p.666–668, 2015.

FARIA, R.O.; NASCENTE, P. S.; MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; ANTUNES, T. A.; SILVEIRA, E. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, estado do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.43, p.198-200, 2010.

FAVALESSA, O. C.; DE PAULA, D. A. J.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; TADANO, T.; LAZERA, M. DOS S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; WALDEREZ SZESZS, M.; SILVA, D.; HAHN, R. C. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, p.1037-1043, 2014.

- FALAGAS, M. E.; MAKRIS, G. C.; DIMOPOULOS, G.; MATTHAIIOU, D. K. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.101–104, 2008.
- FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.3, p.1351–1371, 2000.
- FERNANDES, K. E.; DWYER, C.; CAMPBELL, L. T.; CARTER, D. A. Species in the *Cryptococcus gattii* complex differ in capsule and cell size following growth under capsule-inducing conditions. **mSphere**, v.1, e00350-16, 2016.
- FERREIRA, A. S.; SAMPAIO, A.; MADURO, A. P.; SILVA, I.; TELES, F.; MARTINS, M. L.; INÁCIO, J. Genotypic diversity of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Northern Portugal. **Mycoses**, v.57, p.98–104, 2014.
- FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. **Mycopathologia**, v.162, p.363-368, 2006.
- FILIU, W.F.O.; WANKE, B.; AGUENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.L.; LAZÉRA, M. Cativoiro deaves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.35, p.591-595, 2002.
- FINDLEY, K.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; METIN, B.; KROISS, J.; FONSECA, A.; VILGALYS, R.; HEITMAN, J. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. **Eukaryotic Cell**, v.8, p.353–361, 2009.
- FIRACATIVE, C.; TORRES, G.; RODRÍGUEZ, M.C.; ESCANDÓN, P. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. **Biomédica**, v.21, p.118-123, 2011.
- FRANCO-PAREDES, C.; WOMACK, T.; BOHLMeyer, T.; SELLERS, B.; HAYS, A.; PATEL, K.; LIZARAZO, J.; LOCKHART, S. R.; SIDDIQUI, W.; MARR, K. A. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **Lancet Infectious Diseases**, v.15, p.348–355, 2015.
- FRASER, J. A.; GILES, S. S.; WENINK, E. C.; GEUNES-BOYER, S. G.; WRIGHT, J. R.; DIEZMANN, S.; ALLEN, A.; STAJICH, J. E.; DIETRICH, F. S.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v.27, p.1360–1364, 2005.
- FREIRE, A. K. L.; DOS SANTOS BENTES, A.; DE LIMA SAMPAIO, I.; MATSUURA, A. B. J.; OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I.; WANKE, B.; DE SOUZA, J. V. Molecular

characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, v.55, e145-150, 2012.

GALANIS, E.; MACDOUGALL, L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.251-257, 2010.

GIRISH KUMAR, C. P.; PRABU, D.; MITANI, H.; MIKAMI, Y.; MENON, T. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. **Mycoses**, v.53, p.262–264. 2010.

GUINEA, J.; HAGEN, F.; PELÁEZ, T.; BOEKHOUT, T.; TAHOUNE, H.; TORRES-NARBONA, M.; BOUZA, E. Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain. **Medical Mycology**, v.48, p.942–948, 2010.

GUTCH, R. S.; NAWANGE, S. R.; SINGH, S. M.; YADU, R.; TIWARI, A.; GUMASTA, R.; KAVISHWAR, A. Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, p.1125–1133, 2015.

HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M.-T.; BARTLETT, K. H.; SWINNE, D.; GEERTSEN, E.; KLAASSEN, C. H. W.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.5139–5145, 2010.

HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. **Mycopathologia**, v.170, p.209–211, 2010.

HAGEN, F.; COLOM, M. F.; SWINNE, D.; TINTELOT, K.; IATTA, R.; MONTAGNA, M. T.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; COGLIATI, M.; VELEGRAKI, A.; BURGGRAAF, A.; KAMERMANS, A.; SWEERE, J. M.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H.; BOEKHOUT, T. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, p.1618–1624, 2012.

HAGEN, F.; ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M.-T.; MEIS, J. F.; CHEW, W. H. M.; CURFS-BREUKER, I.; MOUTON, J. W.; HOEPELMAN, A. I.; SPANJAARD, L.; VERWEIJ, P. E.; KAMPINGA, G. A.; KUIJPER, E. J.; BOEKHOUT, T.; KLAASSEN, C. H. Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.1918–1926, 2012.

HAGEN, F.; CERESINI, P. C.; POLACHEK, I.; MA, H.; NIEUWERBURGH, F.; GABALDON, T.; KAGAN, S. E.; PURSALL, R.; HOOGVELD, H. L.; IERSEL, L. J. J.; KLAU, G.W.; KELK, S. M.; STOUGIE, L.; BARTLETT, K. H.; VOELZ, K.; PRYSZCZ, L. P.; CASTAÑEDA, L.; LAZERA, M.; MEYER, W.; DEFORCE, D.; MEIS, J. F.; MAY, R. C.; KLAASSEN, C. H. W.; BOEKHOUT, T. Ancient dispersal of the human fungal

pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. **PLoS ONE**, v.8, e71148, 2013.

HAGEN, F.; CHOWDHARY, A.; PRAKASH, A.; YNTEMA, J-B.; MEIS, J. F. Molecular characterization of *Cryptococcus gattii* genotype AFLP6/VGII isolated from woody debris of divi-divi (*Caesalpinia coriaria*), Bonaire, Dutch Caribbean. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, p.193–196, 2014.

HAGEN, F.; KHAYHAN, K.; THEELEN, B.; KOLECKA, A.; POLACHECK, I.; SIONOV, E.; FALK, R.; PARNMEN, S.; LUMBSCH, H. T.; BOEKHOUT, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetic Biology**, v.78, p.16–48. 2015.

HAGEN, F.; HARE JENSEN, R.; MEIS, J. F.; ARENDRUP, M. C. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato isolates from Denmark. **Mycoses**, v.59, p.576-84, 2016.

HAGEN, F.; LUMBSCH, H. T.; ARSIC ARSENIJEVIC, V.; BADALI, H.; BERTOUT, S.; BILLMYRE, R. B.; BRAGULAT, M. R.; CABAÑES, F. J.; CARBIA, M.; CHAKRABARTI, A.; CHATURVEDI, S.; CHATURVEDI, V.; CHEN, M.; CHOWDHARY, A.; COLOM, M-F.; CORNELLY, O. A.; CROUS, P. W.; CUÉTARA, M. S.; DIAZ, M. R.; ESPINEL-INGROFF, A.; FAKHIM, H.; FALK, R.; FANG, W.; HERKERT, P. F.; FERRER RODRÍGUEZ, C.; FRASER, J. A.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; IDNURM, A.; ILLNAIT-ZARAGOZI, M-T.; KHAN, Z.; KHAYHAN, K.; KOLECKA, A.; KURTZMAN, C. P.; LAGROU, K.; LIAO, W.; LINARES, C.; MEIS, J. F.; NIELSEN, K.; NYAZIKA, T. K.; PAN, W.; PEKMEZOVIC, M.; POLACHECK, I.; POSTERARO, B.; DE QUEIROZ TELLES, F.; ROMEO, O.; SÁNCHEZ, M.; SAMPAIO, A.; SANGUINETTI, M.; SRIBUREE, P.; SUGITA, T.; TAJ-ALDEEN, S. J.; TAKASHIMA, M.; TAYLOR, J. W.; THEELEN, B.; TOMAZIN, R.; VERWEIJ, P. E.; WAHYUNINGSIH, R.; WANG, P.; BOEKHOUT, T. Importance of resolving fungal nomenclature: the case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* Genus. **mSphere**, v.2, e00238-17, 2017.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HEADLEY, S. A.; DI SANTIS, G. W.; DE ALCÂNTARA, B. K.; COSTA, T. C.; DA SILVA, E. O.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; GOMES, L. A.; ALFIERI, A. A.; BRACARENSE, A. P. *Cryptococcus gattii*-induced infections in dogs from Southern Brazil. **Mycopathologia**, v.180, p.265–275, 2015.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; BECKHAM, J. D. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.28, p.300–307, 2015.

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

HOSPENTHAL, D. R.; BENNETT, J. E. Flucytosine monotherapy for cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.260–264, 1998.

HUANG, Y-H.; LIN, I-H.; CHANG, T-C.; TSENG, S-H. Early diagnosis and successful treatment of *Cryptococcus albidus* keratitis: a case report and literature review. **Medicine**, v.94, e885, 2015.

HUSAIN, S.; WAGENER, M.M.; SINGH, N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, p.375-381, 2001.

HUSTON, S. M.; LI, S. S.; STACK, D.; TIMM-MCCANN, M.; JONES, G. J.; ISLAM, A.; BERENGER, B. M.; XIANG, R. F.; COLARUSSO, P.; MODY, C. H. *Cryptococcus gattii* is killed by dendritic cells, but evades adaptive immunity by failing to induce dendritic cell maturation. **Journal of Immunology**, v.191, p.249–261, 2013.

HUSTON, S. M.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; XIANG, R. F.; OGBOMO, H.; STACK, D.; LI, S. S.; TIMM-MCCANN, M.; KYEI, S. K.; OYKHMANN, P.; KWON-CHUNG, K.; MODY, C. H. *Cryptococcus gattii* capsule blocks surface recognition required for dendritic cell maturation independent of internalization and antigen processing. **Journal of Immunology**, v.196, p.1259–1271, 2016.

ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F.; FERNÁNDEZ-ANDREU, C. M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T.; KLAASSEN, C. H. W.; MEIS, J. F. Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. **BMC Infectious Diseases**, v.10, p.1-7, 2010.

ILLNAIT-ZARAGOZI, M-T.; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F.; FERNÁNDEZ-ANDREU, C. M.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H. W. Microsatellite typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. **PLoS ONE**, v.5, e9124, 2010.

ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F.; FERNÁNDEZ-ANDREU, C. M.; PERURENA-LANCHA, M. R.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H. Environmental isolation and characterisation of *Cryptococcus* species from living trees in Havana city, Cuba. **Mycoses**, v.55, e138–44, 2012.

IQBAL, N.; DEBESS, E. E.; WOHRLE, R.; SUN, B.; NETT, R. J.; AHLQUIST, A. M.; CHILLER, T.; LOCKHART, S. R.; *Cryptococcus gattii* public health working group. Correlation of genotype and *in vitro* susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.539–544, 2010.

KANGOGO, M.; BADER, O.; BOGA, H.; WANYOIKE, W.; FOLBA, C.; WORASILCHAI, N.; WEIG, M.; GROß, U.; BIL, C. C. Molecular types of *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex from clinical and environmental sources in Nairobi, Kenya. **Mycoses**, v.58, p.665–670, 2015.

KANO, R.; OKUBO, M.; YANAI, T.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. First isolation of azole-resistant *Cryptococcus neoformans* from feline cryptococcosis. **Mycopathologia**, v.180, p.427–433, 2015.

KANTARCIOĞLU, A. S.; BOEKHOUT, T.; DE HOOG, G. S.; THEELEN, B.; YÜCEL, A.; EKMEKCI, T. R.; FRIES, B. C.; IKEDA, R.; KOSLU, A.; ALTAS, K. Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluens* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and *in vitro* antifungal susceptibilities. **Medical Mycology**, v.45, p.173–181, 2007.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.3059–3066, 2002.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L.M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v.35, p.51–58, 2007.

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

KIDD, S. E.; BACH, P. J.; HINGSTON, A. O.; MAK, S.; CHOW, Y.; MACDOUGALL, L.; KRONSTAD, J. W.; BARTLETT, K. H. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.51–7, 2007a.

KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S.; BACH, P. J.; CHEN, H.; HINGSTON, A. O.; KRONSTAD, J. W.; BARTLETT, K. H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.1433–43, 2007b.

KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v.6, p.574–587, 2006.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; WICKES, B. L.; MEYER, W.; CUOMO, C. A.; WOLLENBURG, K. R.; BICANIC, T. A.; CASTAÑEDA, E.; CHANG, Y. C.; CHEN, J.; COGLIATI, M.; DROMER, F.; ELLIS, D.; FILLER, S. G.; FISHER, M. C.; HARRISON, T. S.; HOLLAND, S. M.; KOHNO, S.; KRONSTAD, J. W.; LAZERA, M.; LEVITZ, S. M.; LIONAKIS, M. S.; MAY, R. C.; NGAMSKULRONGROJ, P.; PAPPAS, P. G.; PERFECT,

J. R.; RICKERTS, V.; SORRELL, T. C.; WALSH, T. J.; WILLIAMSON, P. R.; XU, J.; ZELAZNY, A. M.; CASADEVALL, A. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **mSphere**, v.2, e00357-16, 2017.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 2016.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINZ_VACCARI E.M., MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9. edição, 2002. São Paulo, SP: Sarvier. p. 416-435.

LEITE, D.P.; AMADIO, J.V.R.S.; MARTINS, E.R.; SIMOES, S.A.A.; YAMAMOTO, A.C.A.; LEALSANTOS, F.A.; TAKAHARA, D.T.; HAHN, R.C. *Cryptococcus* spp. isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v.7, p.1-7, 2012.

LEVITZ, S.M.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*: The once-sleeping giant is fully awake. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.461–462, 2006.

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

LINARES, C.; COLOM, M. F.; TORREBLANCA, M.; ESTEBAN, V.; ROMERA, Á.; HAGEN, F. Environmental sampling of *Ceratonia siliqua* (carob) trees in Spain reveals the presence of the rare *Cryptococcus gattii* genotype AFLP7/VGIV. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.32, p.269–272, 2015.

LITVINTSEVA, A. P.; MARRA, R. E.; NIELSEN, K.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa. **Eukaryotic Cell**, v.2, p.1162–1168, 2003.

LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G. Population genetic analyses reveal the African origin and strain variation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **PLoS Pathogens**, v.8, e1002495, 2012.

LIU, Y.; MA, S.; WANG, X.; XU, W.; TANG, J. *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. **Medical Mycology Case Reports**, v.3, p.8-10, 2014.

LIU, X.; WANG, Q.M; GÖKER, M; GROENEWALD, M; KACHALKIN, A.V; LUMBSCH, H.T.; MILLANES, A. M.; WEDIN, M.; YURKOV, A. M.; BOEKHOUT, T.; BAI, F. Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomyces*. **Studies in Mycology**, v.81, p.85-147, 2015a.

LIU, X.Z; WANG, Q.M; THEELEN, B; GROENEWALD, M; BAI, F.Y; BOEKHOUT, T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous

basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. **Studies in Mycology**, v.81, p.1-26, 2015b.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; BOLDEN, C. B.; DEBESS, E. E.; MARSDEN-HAUG, N.; WORHLE, R.; THAKUR, R.; HARRIS, J. R. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.73, p.144–148, 2012.

LUGARINI, C.; GOEBEL, C.S.; CONDAS, L.A.Z.; MURO, M.D.; FARIAS, M.R.; FERREIRA, F.M.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.166, p.61–69, 2008.

MARQUES, S. A.; BASTAZINI, I.; MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; BARBIERI D'ELIA, M. P.; LASTÓRIA, J. C.; MARQUES, M. E. A. Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients: primary cutaneous cryptococcosis. **International Journal of Dermatology**, v.51, p.780–784, 2012.

MARTINS, L. M. S.; WANKE, B.; LAZÉRA, M. DOS S.; TRILLES, L.; BARBOSA, G. G.; MACEDO, R. C. L. DE.; CAVALCANTI, M. D. O. A.; EULÁLIO, K. D.; CASTRO, J. A.; SILVA, A. S.; NASCIMENTO, F. F.; GOUVEIA, V. A.; MONTE, S. J. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 106:725–730, 2011.

MATOS, C. S.; DE SOUZA ANDRADE, A.; OLIVEIRA, N. S.; BARROS, T. F. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.31, p.1647–1652, 2012.

MATSUMOTO, M. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; BAEZA, L. C.; MELHEM, M. DE S. C.; MEDES-GIANNINI, M. J. S. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.49, p.41–47, 2007.

MAY, R. C.; STONE, N. R. H.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, p.106–117, 2016.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.189–195, 2003.

MEYER, W.; AANENSEN, D. M.; BOEKHOUT, T.; COGLIATI, M.; DIAZ, M. R.; ESPOSTO, M. C.; FISHER, M.; GILGADO, F.; HAGEN, F.; KAOCHAROEN, S.;

- LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G.; SIMWAMI, S. P.; TRILLES, L.; VIVIANI, M. A.; KWON-CHUNG, J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v.47, p.561–570, 2009.
- MOLINA-LEYVA, A.; RUIZ-CARRASCOSA, J.C.; LEYVA-GARCIA, A.; HUSEIN-ELAHMED, H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. **International Journal of Infectious Diseases**, v.17, e1232–e1233, 2012.
- NASCIMENTO, E.; BONIFÁCIO DA SILVA, M. E. N.; MARTINEZ, R.; VON ZESKA KRESS, M. R. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus gattii* molecular type VGI in Brazil: a case report and review of literature. **Mycoses**, v.57, p.442–447, 2014.
- NASSER, N.; VIEIRA, A.G. Criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente. Primay cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.6, p.1178-1180, 2011.
- NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v.30, p.599–609, 2012.
- NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.73-77, 2003.
- NOGUERA, M. C.; ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. Cryptococcosis in Atlántico, Colombia: an approximation of the prevalence of this mycosis and the distribution of the etiological agent in the environment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, p.580–586, 2015.
- NYAZIKA, T. K.; HAGEN, F.; MEIS, J.F.; ROBERTSON, V. J. *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIV-infected individuals in Harare, Zimbabwe. **Journal of Infection**, v.72, p.745–752, 2016.
- NYAZIKA, T. K.; HAGEN, F.; MACHIRIDZA, T.; KUTEPA, M.; MASANGANISE, F.; HENDRICKX, M.; BOEKHOUT, T.; MAGOMBEI-MAJINJIWA, T.; SIZIBA, N.; CHIN'OMBE, N.; MATEVEKE, K.; MEIS, J. F.; ROBERTSON, V. J. *Cryptococcus neoformans* population diversity and clinical outcomes of HIV-associated cryptococcal meningitis patients in Zimbabwe. **Journal of Medical Microbiology**, v.65, p.1281-1288, 2016.
- PAN, W.; KHAYHAN, K.; HAGEN, F.; WAHYUNINGSIH, R.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; IKEDA, R.; TAJ-ALDEEN, S. J.; KHAN, Z.; IMRAN, D.; SJAM, R.; SRIBUREE, P.; LIAO, W.; CHAICUMPAR, K.; INGVIYA, N.; MOUTON, J. W.; CURFS-BREUKER, I.; BOEKHOUT, T.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H. Resistance of Asian *Cryptococcus neoformans* serotype A is confined to few microsatellite genotypes. **PLoS ONE**, v.7, e32868, 2012.

PAPPAS, P. G.; POWDERLY, W. G.; SINGH, N.; SOBEL, J. D.; SORRELL, T. C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, p.291–322, 2010.

PAPPAS, P. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v.124, p.61-79, 2013.

PASA, C. R.; CHANG, M. R.; HANS-FILHO, G. Post-trauma primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host by *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycoses**, v.55, e1–3, 2012.

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

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.;

RAJASINGHAM, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N.; GOVENDER, N. P.; CHILLER, T. M.; DENNING, D. W.; LOYSE, A.; BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v.17, p.873-81, 2017.

RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; KHAN, Z. U. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. **Medical Mycology**, v.43, p.67-71, 2005.

RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; CHOWDHARY, A.; PREETI SINHA, K.; KHAN, Z. U.; SUN, S.; Xu, J. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. **Medical Mycology**, v.46, p.823–833, 2008.

REOLON, A.; PEREZ, L.R.R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.5, p.29-33, 2004.

RIBEIRO, M.A.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.50, p.315-320, 2008.

SANTOS, W. R. A. DOS.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P. S. E.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M. DO.; MEDEIROS, R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. D. E. C.; MACÊDO, R. C.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. DOS S. Primary endemic Cryptococcosis *gattii* by molecular type VGII

in the state of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.813–818, 2008.

SILVA, D. C.; MARTINS, M. A.; SZESZS, M. W.; BONFIETTI, L. X.; MATOS, D.; MELHEM, M. S. C. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. **Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases**, v.72, p.332–339, 2012.

SINGH, N.; ALEXANDER, B. D.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F.; GUPTA, K. L.; JOHN, G. T.; DEL BUSTO, R.; KLINTMALM, G. B.; SOMANI, J.; LYON, G. M.; PURSELL, K.; STOSOR, V.; MUNOZ, P.; LIMAYE, A. P.; KALIL, A. C.; PRUETT, T. L.; GARCIA-DIAZ, J.; HUMAR, A.; HOUSTON, S.; HOUSE, A. A.; WRAY, D.; ORLOFF, S.; DOWDY, L. A.; FISHER, R. A.; HEITMAN, J.; WAGENER, M. M.; HUSAIN, S.; Cryptococcal collaborative transplant study group. *Cryptococcus neoformans* in organ transplant recipients: impact of calcineurin-inhibitor agents on mortality. **Journal of Infectious Diseases**, v.195, p.756–764, 2007.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.2804–2815, 2009.

SOARES, M.C.B.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.T.; CASEIRO, M.M.; COSTA, S.O.P. Ambiental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.47, p.31-36, 2005.

SOUTO, A. C.; BONFIETTI, L. X.; FERREIRA-PAIM, K.; TRILLES, L.; MARTINS, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; PHAM, C. D.; MARTINS, L.; DOS SANTOS, W.; CHANG, M.; BRITO-SANTOS, F.; SANTOS, D. C.; FORTES, S.; LOCKHART, S. R.; WANKE, B.; MELHEM, M. S.; LAZÉRA, M. S.; MEYER, W. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, e0004885, 2016.

SOUZA, L.K.H.; SOUZA-JUNIOR, A.H.; COSTA, C.R.; FAGNELLO, J.; VAINSTEIN, M.H.; CHAGAS, A.L.B.; SOUZA, A.C.M.; SILVA, M.R.R. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v.53, p.62-67, 2009.

SPRINGER, D.J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.14-20, 2010.

SUN, S.; BILLMYRE, R. B.; MIECZKOWSKI, P. A.; HEITMAN, J. Unisexual reproduction drives meiotic recombination and phenotypic and karyotypic plasticity in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Genetics**, v.10, e1004849, 2014.

TAKAHARA, D. T.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; PAULA, D. A.; NAKAZATO, L.; ANZAI, M. C.; LEITE JÚNIOR, D. P.; PAULA, C. R.; HAHN, R. C.

First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.55, p.371-376, 2013.

TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

THOMPSON, G. R.; RENDON, A.; DOS SANTOS, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; AZIE, N.; MAHER, R.; LEE, M.; KOVANDA, L.; ENGELHARDT, M.; VAZQUEZ, J. A.; CORNELLY, O. A.; PERFECT, J. R. Isavuconazole treatment of cryptococcosis and dimorphic mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, v.63, p.356-362, 2016.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. DOS S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.455-562, 2008.

TRILLES, L.; MEYER, W.; WANKE, B.; GUARRO, J.; LAZÉRA, M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. **Medical Mycology**, v.50, p.328–332, 2012.

VANHOVE, M.; BEALE, M. A.; RHODES, J.; CHANDA, D.; LAKHI, S.; KWENDA, G.; MOLLOY, S.; KARUNAHARAN, N.; STONE, N.; HARRISON, T. S.; BICANIC, T.; FISHER, M. C. Genomic epidemiology of *Cryptococcus* yeasts identifies adaptation to environmental niches underpinning infection across an African HIV/AIDS cohort. **Molecular Ecology**, v.26, p.1991-2005, 2016.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.2303–2311, 2010.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y-P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection & Immunity**, v.77, p.4345–4355, 2009.

VÉLEZ, N.; ESCANDÓN, P. Report on novel environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia: *Tabebuia guayacan* and *Roystonea regia*. **Medical Mycology**, v.55, p.794-797, 2017.

VECCHIARELLI, A.; PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; KENNO, S.; PERITO, S.; CENCI, E.; MONARI, C. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiology**, v.8, p.1107–1116, 2013.

VICENTE, V.A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Ambient

isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v.61, p.137–144, 2008.

VOELZ, K. *et al.* Transmission of hypervirulence traits via sexual reproduction within and between lineages of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **PLOS Genetics**, v.9, e1003771, 2013.

VU, K.; THAM, R.; UHRIG, J. P.; THOMPSON, G. R.; NA POMBEJRA, S.; JAMKLANG, M.; BAUTOS, J. M.; GELLI, A. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. **mBio**, v.5, e01101-14, 2014.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), p. 315–322. Academic Press, San Diego, 1990.