



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELIANDRO REIS TAVARES

**DIFERENCIAÇÃO ENTRE *Cryptococcus gattii* e
Cryptococcus neoformans UTILIZANDO A REGIÃO DO
ESPAÇO INTERGÊNICO 1 (IGS1) DO DNA RIBOSSOMAL
POR PCR EM TEMPO REAL**

ELIANDRO REIS TAVARES

**DIFERENCIAÇÃO ENTRE *Cryptococcus gattii* e
Cryptococcus neoformans UTILIZANDO A REGIÃO DO
ESPAÇO INTERGÊNICO 1 (IGS1) DO DNA RIBOSSOMAL
POR PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucy Megumi Yamauchi Lioni.

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T235d Tavares, Eliandro Reis.
Diferenciação entre *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* utilizando a região do espaço intergênico 1 (IGS1) do DNA ribossomal por PCR em tempo real / Eliandro Reis Tavares. – Londrina, 2012.
48 f. : il.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. *Cryptococcus neoformans* – Teses. 2. *Cryptococcus gattii* – Teses. 3. Diferenciação – Teses. 4. Espaço intergênico – Teses. I. Lioni, Lucy Megumi Yamauchi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 582.282.23

ELIANDRO REIS TAVARES

DIFERENCIAÇÃO ENTRE *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* UTILIZANDO A REGIÃO DO ESPAÇO INTERGÊNICO 1 (IGS1) DO DNA RIBOSSOMAL POR PCR EM TEMPO REAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Tânia Fraga de Barros
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Prof. Dr. Emerson Jose Venancio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Lucy Megumi Yamauchi Lioni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 9 de Março de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força, determinação e persistência;

À minha família, pelo apoio;

*Às minhas orientadoras Lucy M. Y. Lioni e Sueli F. Y. Ogatta, pela sabedoria
que me incentiva a perscrutar os desafios do conhecimento;*

*Aos membros da Banca, Professor Dr. Emerson José Venâncio, Professora
Dr^a. Tânia Barros*

*Aos meus amigos Kelly C. Santos, Carla Decanine, Rafaela K. Caires, Vanessa
J. Victorino, Bruno F. Costa, Catia S. de Almeida, Bruna C. Rossaneis, Maira
N. Fregonesi, que sempre me incentivaram e me deram apoio em todos os
momentos;*

*Aos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos,
Jackson S. Gundi, Thaisa Kataoka, Felipe, Carline Longhi, Jussevânia P.
Santos, Suelen B. Paula, Alexandre T. Morey, pelos momentos agradáveis e
pelas sugestões para com o referido trabalho;*

*Aos meus amigos das horas de diversão, depressão enfim, de tudo e pra tudo,
Maria C. Borba, Ana C. Petryszyn, Ana Claudia Petryszyn, Amanda Mattos,
Ellis S. Bitencourt;*

Aos meus colegas de laboratórios;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

***“As Únicas certezas que temos, além da vida e da morte,
são aquelas feitas pelas Ciências. O resto, são dívidas e
dívidas.”***

Álvaro Granha Loregian

TAVARES, Eliandro Reis. **Diferenciação entre *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* utilizando a região do espaço intergênico 1 (IGS1) do DNA ribossomal por PCR em tempo real.** 2012. 48f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A incidência de infecções fúngicas oportunistas tem aumentado principalmente entre pacientes portadores de HIV. A criptococose é uma doença infecciosa fúngica potencialmente fatal, cosmopolita, que acomete mamíferos domésticos, animais silvestres e o homem; os sintomas clínicos podem variar de infecção pulmonar assintomática à doença disseminada e meningite. A criptococose é causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, sendo *C. neoformans* e *C. gattii* as espécies clinicamente mais importantes. Estas acometem principalmente pacientes imunossuprimidos, entretanto *C. gattii* pode causar doença também em indivíduos imunocompetentes. Neste trabalho foi padronizada uma reação de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real para a identificação de *C. neoformans* e *C. gattii* tendo como alvo a região IGS1 (*intergenic spacer 1*) do rDNA. Sequências correspondentes à região IGS1 de *C. gattii* e *C. neoformans* foram buscadas no GenBank e, após a análise, foi deduzida as sequências consensos, utilizadas para a síntese dos oligonucleotídeos iniciadores CnIGS1-F e CnIGS1-R, e CglIGS1-F e CglIGS1-R específicos para *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente. As cepas *C. neoformans* ATCC 66031 e *C. gattii* ATCC 56990 foram utilizadas como referência para os ensaios. Inicialmente, o DNA genômico foi obtido de células em fase de crescimento exponencial, e quantificado por espectrometria a 260/280 nm. A reação foi realizada usando 100 ng de DNA como molde, *Platinum Quantitative SuperMix-UDG kit*, oligonucleotídeos iniciadores; as amostras foram corridas em um termociclador Rotor Gene 6000. As curvas de dissociação (*melting curve*) foram geradas em ambas as corridas, entre 60° C e 95° C, com um aumento de 0,5 °/segundo, para observação dos picos de dissociação. Os resultados mostraram dois diferentes picos de dissociação: 82,8 °C e 84,2 °C para *C. gattii* e *C. neoformans*, respectivamente. Não foi observada amplificação quando DNA total, de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *H. capsulatum*, *T. rubrum*, *S. schenckii*, *P. brasiliensis* ou *H. sapiens* foi utilizada na PCR. Em conclusão, a amplificação por PCR em tempo real foi específica, permitindo a identificação de ambos os fungos, mostrando que a região IGS1 apresenta polimorfismo, podendo ser usada como um marcador molecular. Assim, os oligonucleotídeos iniciadores desenhados podem ser utilizados na identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Palavras chave: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. Diferenciação. Espaço intergênico. PCR em tempo real.

TAVARES, Eliandro Reis. **Diferenciação entre *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* utilizando a região do espaço intergênico 1 (IGS1) do DNA ribossomal por PCR em tempo real.** 2012. 48f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The incidence of opportunistic fungal infection has increased specially among the HIV patients. Cryptococcosis is an infectious fungal disease potentially fatal, cosmopolitan, affecting domestic mammals, wild animals and humans; the clinical symptoms range from asymptomatic pulmonary colonization to disseminated disease and meningitis. Cryptococcosis is caused by yeast of the genus *Cryptococcus*, whereas *C. neoformans* and *C. gattii* are the clinically most important species. These affect mainly immunocompromised patients; however *C. gattii* can also cause disease in immunocompetent individuals. In this work it was standardized an amplification by real time polymerase chain reaction (PCR) to identify *C. neoformans* and *C. gattii*, targeting the IGS1 (intergenic spacer 1) region of the rDNA. Sequences corresponding to IGS1 region of *C. gattii* and *C. neoformans* were retrieved from GenBank, and, after sequence analyses, it was deduced the consensus sequences used for the synthesis of CnIGS1-F/R and CgIGS1-F/R primers, specific for *C. neoformans* and *C. gattii*, respectively. The strains *C. neoformans* ATCC 66301 and *C. gattii* ATCC 56990 were used as reference for the assays. Initially, the genomic DNAs were obtained from cells in exponential growth phase, and quantify by spectrometry at 260/280nm. The reactions were performed using 100 ng of DNA as template, *Platinum Quantitative SuperMix-UDG kit*, primers, and the samples were running in the Rotor Gene 6000 thermocycler. The melting curves were generated from both runs from 60 to 95 °C at 0.5 °C/sec to show the melting peaks. The results showed the two distinctive melting temperatures: 82.8 °C e 84.2 °C for *C. gattii* e *C. neoformans*, respectively. No amplification were observed when total DNA of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *H. capsulatum*, *T. rubrum*, *S. schenckii*, *P. brasiliensis* or *H. sapiens* was used in PCR. As conclusion, the real time PCR amplification was specific, allowing the identification of both fungus, showing that the IGS 1 sequence presents polymorphism and it can be used as molecular target. Overall, the designed primers can be used in the identification of *C. neoformans* and *C. gattii*.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. Differentiation. Intergenic spacer. Real-time PCR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Infecções Fúngicas	10
1.1.1	Criptococose.....	12
1.2	Diagnóstico de Infecções Fúngicas.....	16
1.2.1	Diagnóstico Molecular das Infecções Fúngicas	19
1.2.2	Diagnóstico da Criptococose	23
1.3	Justificativa.....	25
1.4	Objetivos	27
2	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	28
3	CONCLUSÃO.....	40
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Fúngicas

A incidência das infecções causadas por fungos tem aumentado muito nas últimas décadas e representa um grande desafio para a medicina (Denning et al., 2003). Acredita-se que o número de casos dessas infecções tem aumentado devido a diversos fatores como o uso de substâncias terapêuticas e antineoplásicas, antimicrobianos e medicamentos imunossupressores; e o aumento do número de indivíduos com o sistema imune comprometido, como pacientes com câncer, AIDS, queimados, transplantados e mesmo indivíduos idosos e recém-nascidos (Baddley et al., 2001; Clark e Hajjeh, 2002; Manzoni et al., 2006; Castón et al., 2007; Hattori et al., 2007).

A infecção causada por fungos é uma importante causa de mortalidade e morbidade em pacientes hospitalizados (Colombo et al., 2006). No ambiente hospitalar, a presença de fungos no material utilizado nos pacientes, como cateteres, sondas, nos aparelhos de ar condicionado e mesmo nas mãos do pessoal do corpo médico, tem sido associada ao aparecimento de surtos de infecções fúngicas (Pasqualotto et al., 2005). Além do mais, os fungos, como outros agentes oportunistas, têm uma ampla distribuição na natureza, sendo encontrados no solo, no ar, na água, dentro das casas, nas plantas, nos animais e no próprio homem (Taylor et al., 1999).

Embora o conhecimento sobre a patogenicidade dos fungos e os mecanismos de virulência está sendo gerado, a busca de novas terapias e métodos de diagnósticos deve ser estimulada, pois as infecções fúngicas

invasivas ainda são causas significantes de morbidade e mortalidade entre os pacientes imunossuprimidos. Os pacientes com leucemia mieloide aguda, por exemplo, apresentam altos índices de infecções causadas por microrganismos como *Aspergillus* spp. e *Candida* spp.; além disso, infecções causadas por zigomicetos, dentre eles, os gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Absidia*, *Apophysomyces*, *Saksenaea*, *Cunninghamella*, *Cokeromyces* e *Syncephalastrum*, também foram descritas (Revisto por Severo et al., 2010).

As dificuldades em um diagnóstico preciso e precoce, faz com que se adote uma terapia com antifúngicos de profilaxia universal, resultando no aumento de custos, toxicidade e o aparecimento de resistência a esses medicamentos (Pagano et al., 2010).

As micoses sistêmicas como paracoccidiodomicose, histoplasmose, coccidiodomicose, zigomicoses, aspergilose e criptococose, dentre outras são frequentemente analisadas durante a avaliação de uma doença pulmonar, pois são causas comuns de pneumonia e necessitam de testes específicos para o seu diagnóstico. É importante salientar que a falha na identificação dos agentes etiológicos dessas micoses podem resultar em um desfecho fatal devido à rápida progressão da doença sendo esse o maior desafio dos médicos atualmente (Wheat, 2009).

A identificação de agentes causadores de infecções fúngicas é bastante complexa, devido ao grande número de espécies responsáveis por infectar hospedeiros imunocomprometidos (Borman et al., 2008). Esses indivíduos apresentam um alto risco de infecção por fungos devido à ampla distribuição do patógeno no ambiente hospitalar e a diminuição da resposta imune celular observada neles.

1.1.1 Criptococose

A criptococose é uma doença fúngica potencialmente fatal (Malik et al., 1997), cosmopolita (Honsho et al., 2003; Reolon et al., 2004) que acomete mamíferos domésticos, principalmente o gato e o cão (Malik et al., 1997; Larsson et al., 2003), animais silvestres e o homem (Pereira e Coutinho, 2003; Honsho et al., 2003; Taboada, 2004), sendo também conhecida como torulose ou blastomicose européia. A criptococose é causada pelos fungos encapsulados *C. gatti* e *C. neoformans*.

Cryptococcus spp. foi primeiramente isolado do ambiente (suco de pêssigo) pelo italiano Francesco Sanfelice em 1894, e posteriormente isolado de uma paciente pelo patologista Busse e pelo médico Buschke. *Cryptococcus* spp. tem se tornado uma grande ameaça em pacientes imunodeprimidos; o Centro para Controle de Doenças estima que ocorra mais de um milhão de novos casos por ano em todo o mundo, causando cerca de 650000 mortes em pacientes portadores de HIV, tornando a morte por criptococose mais frequente que aquela causada por tuberculose (Poeta e Casadevall, 2011). Estes patógenos são responsáveis por cerca de 1 milhão de casos de meningite criptocócica por ano em pacientes com SIDA. No Brasil, com o aumento do número de pacientes portadores de HIV, observou-se um aumento no número de infecções causadas por *C. neoformans*. Segundo o Ministério da Saúde – Coordenação Nacional de DST/AIDS, no período entre 1980 e 1997, as infecções oportunistas por *C. neoformans*, associadas a pacientes com HIV, representou 4,3% (Revisto por Casali et al 2001). Entretanto, estes patógenos

apresentam, também, como fungo oportunista, explorando outras formas de imunossupressão, tais como câncer e terapias imunossupressoras (Fernandes et al., 2000).

A infecção por *Cryptococcus* spp. inicia-se no trato respiratório causando um quadro de doenças que vai desde infecções assintomáticas à doença grave, incluindo pneumonia e infecção disseminada em vários sítios, como sistema nervoso central, olhos e pele (Goldman et al., 2010).

C. neoformans tem distribuição mundial sendo que *C. neoformans* var. *grubii* é mais amplamente distribuído pelo mundo, sendo responsável por 95% das infecções (Severo et al., 2009), enquanto *C. neoformans* var. *neoformans* está presente em áreas de clima temperados. *C. gattii* está distribuído em regiões tropicais e subtropicais, como Austrália, sudoeste da Ásia, África Central e áreas tropicais e subtropicais das Américas (Severo et al., 2009, Siachoque, et al. 2010).

Cryptococcus sp. apresenta uma cápsula de polissacarídeo, sendo considerada uma característica distintiva que o separa das demais leveduras de importância médica (Severo et al., 2009). O polissacarídeo encontrado na cápsula é composto por manose, xilose e ácido glicurônico, numa proporção de 7:2:2 (Ikeda, 1985). O tamanho da cápsula varia de acordo com a cepa e com as condições de cultura, podendo apresentar as formas arredondada ou ovalada (Casadevall et al., 1998).

A maior parte dos isolados de *C. neoformans* apresentam um diâmetro da cápsula, variando entre 4-10 μm , com algumas atingindo apenas 2-5 μm . Em algumas células isoladas de tecido, foi observado um diâmetro de até 80 μm , sendo que, o desenvolvimento de uma cápsula gigante em tecido pode

estar relacionado com a alta tensão de CO₂ nos tecidos e/ou a fatores nutricionais (Casadevall et al., 1998).

Cryptococcus sp. inicialmente foi classificado em cinco sorotipos diferentes (A, B, C, D e AD) e em oito genótipos moleculares. A classificação em sorotipos está relacionada com as reações de aglutinação dos antígenos dos polissacarídeos capsulares. As linhagens com os sorotipos A, D e AD pertenciam à espécie *C. neoformans* var. *neoformans* enquanto as linhagens B e C pertenciam à espécie *C. neoformans* var. *gattii*. (Ellis e Pfeiffer, 1990; Severo et al., 2009). Entretanto, evidências genéticas, fenotípicas e clínicas permitiram a separação do complexo em 2 espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii* (Kwon-Chung et al., 2002). Dentro da espécie *C. neoformans*, a linhagem A foi classificada como *C. neoformans* var. *grubii* e a linhagem D como *C. neoformans* var. *neoformans*, classificação essa baseada nas diferenças capsulares e genômicas (Severo et al., 2009).

A presença de polissacarídeo na cápsula atua como um fator de virulência, de maneira análoga àquelas de bactérias encapsuladas, tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*. Outros fatores, também, podem ser citados como associados à virulência desses patógenos: a presença da enzima fenoloxidase que sintetiza melanina e outros pigmentos a partir de precursores fenólicos e da enzima urease, responsável pela hidrólise da uréia, e a capacidade de crescimento à 37° C (Revisto por Casali et al, 2001).

Com relação à infecção humana, o sorotipo A é o mais frequente no Brasil, caracterizando-se por apresentar um acentuado dermatropismo. Nos casos de criptococose sistêmica as lesões cutâneas são observadas entre 10%

e 15% dos pacientes. A criptococose cutânea primária pode ocorrer de forma mais rara, como resultado da inoculação primária na pele. No entanto, devido à variação dessas lesões, para o correto diagnóstico é necessário considerar a história clínica e exames laboratoriais complementares (Bivanco et al., 2006).

O sistema nervoso central e o trato respiratório são os órgãos mais acometidos em infecções por *C. neoformans* e *C. gattii*. Dentre eles, o pulmão é o sítio mais frequente, podendo apresentar desde infecções assintomáticas até pneumonia grave. A infecção do sistema nervoso pode causar meningite aguda, subaguda ou crônica, ou até uma meningoencefalite grave (Severo et al., 2009). A preferência pelo sistema nervoso central, está relacionada com a presença de nutrientes assimiláveis pelo fungo, como tiamina, ácido glutâmico, glutamina, carboidratos e minerais, bem como a ausência de resposta inflamatória no tecido cerebral (Severo et al., 1998). As substâncias presentes no cérebro são utilizadas pelo microrganismo para a síntese da melanina, ou seja, utilizadas como fonte de carbono; entretanto, o cérebro, também, é utilizado como um local de sobrevivência pelo fungo (Rodrigues et al., 1999)

C. gattii e *C. neoformans* apresentam diferentes manifestações clínicas. Essas leveduras podem acometer todos os órgãos do corpo, e dependendo do estado imunológico do hospedeiro, podem ocorrer infecções disseminadas em múltiplos sítios (Perfect e Casadevall, 2002). Em infecções causadas por *C. gattii* observa-se uma maior frequência de hidrocefalias e lesões cerebrais focais (Severo et al 1999; Sorrell, 2001). É observada, também, uma maior predominância de criptococomas no pulmão e no cérebro, a resposta aos antifúngicos é mais lenta, além da ocorrência de um maior número de sequelas, bem como de intervenções cirúrgicas (Sorrell, 2001).

C. gattii pode, também, acometer pacientes imunocompetentes, uma característica que está relacionada com genes que determinam os fatores de virulência espécie. Ensaio moleculares permitiram a divisão de *C. gattii* em 4 tipos moleculares filogenéticos diferentes (VGI, VGII, VGIII e VGIV); os tipos VGI e VGII estão associados com infecções em pacientes imunocompetentes, enquanto que os tipos VGIII e VGIV apresentam perfis epidemiológicos similares a *C. neoformans*, infectando pacientes imunodeprimidos (Revisto por Byrnes III et al, 2011).

1.2 Diagnóstico de Infecções Fúngicas

As infecções fúngicas podem ser causadas por fungos dimórficos (*Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*), leveduriformes (*Cryptococcus* sp.) e filamentosos (*Aspergillus* sp.). A história clínico-epidemiológica juntamente com exames de imagem leva a um diagnóstico presuntivo. Esses são dados importantes, pois indicam o procedimento mais adequado para um esclarecimento etiológico (Xavier et al., 2009)

O diagnóstico das infecções causadas por fungos deve ser rápido, pois é fundamental para o tratamento adequado do paciente e tem um impacto profundo no prognóstico da doença (Caillot et al., 1997). Com o advento das novas drogas antifúngicas, aumentou a perspectiva de controle dessas infecções. Entretanto, a identificação do patógeno é difícil, mas de grande importância para o início de uma terapia adequada, diminuindo assim a alta taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (Einsele et al., 1997).

O diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas é baseado na detecção do microrganismo por microscopia direta em amostras clínicas, isolamento, crescimento e identificação do patógeno em cultura, técnicas essas consideradas os métodos padrão ouro. No entanto, a obtenção do material biológico para análise ainda apresenta dificuldades (Kiedziarska et al., 2007). Devido a esse fato, outros métodos sem necessidade de cultivo do microrganismo, como a detecção sorológica ou de marcadores da presença dos mesmos, como antígenos ou material genético ou metabólitos tem sido desenvolvidos (Marimon et al., 2007).

A observação direta do fungo é um método rápido e de baixo custo. Porém, na maioria dos casos não permite a identificação da espécie ou mesmo do gênero de fungos que não apresentam estruturas morfológicas típicas, como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigattus* (Marimon et al., 2007).

A cultura celular é um importante método de identificação de espécies de fungos, porém, é uma metodologia que requer um corpo técnico altamente especializado para se fazer a identificação. Estudos têm demonstrado que espécies previamente caracterizadas apresentam complexidade genética, representando diferentes espécies, com observado em isolados de *Sporothrix schenckii* que foram identificados como pertencentes às novas espécies *S. brasilienses*, *S. globosa* e *S. mexicana* (Marimon et al., 2007).

O tempo do diagnóstico também deve ser considerado, uma vez que a cultura celular pode demorar várias semanas até ter um resultado definitivo, o que muitas vezes faz com que o clínico inicie o tratamento antes de se ter o diagnóstico laboratorial. E ainda, a cultura apresenta um baixo índice de

positividade e em alguns casos, os resultados são raramente positivos (Hope et al., 2005).

Os testes histopatológicos são comumente utilizados para o diagnóstico, porém a presença de fungos com características morfológicas atípicas é comum, dificultando a identificação do agente. Em alguns casos o fungo não é observado, mesmo utilizando técnicas de coloração específicas como Grocott e ácido periódico-Schiff (Loulergue et al., 2007).

Os ensaios sorológicos têm como marcadores os antígenos altamente imunogênicos, como os componentes das parede celular ou da cápsula dos fungos. Durante o curso da infecção sistêmica esses antígenos estão presentes na corrente sanguínea de forma transitória onde são eliminados por formar imunocomplexos ou serem endocitados pelas células de Kupffer (Yeo e Wong, 2002).

A detecção dos anticorpos traz informações importantes para o diagnóstico. No entanto, nas infecções fúngicas invasivas, os testes imunológicos não são frequentemente utilizados por apresentarem baixa sensibilidade e especificidade devido à presença dos mesmos nos pacientes colonizados e não infectados. Além disso, nos pacientes imunossuprimidos ocorre uma baixa resposta imune ao microrganismo levando a uma pequena quantidade de anticorpos específicos. Entre as limitações da técnica sorológica pode-se destacar a reatividade cruzada entre as espécies, presença de anticorpos comuns entre os microrganismos patogênicos e os comensais e a ausência da padronização dos antígenos e dos métodos utilizados na quantificação dos anticorpos (Yeo e Wong, 2002).

Um outro ponto que deve ser considerado é que os testes envolvendo sorologia podem ser influenciados por outros fatores, como as características individuais de cada soro, o isolado do fungo que causou a doença e a resposta imune individual contra um isolado específico que pode carregar diferentes epítomos antigênicos, e muitos dos resultados obtidos não são reprodutíveis (Albuquerque et al., 2005).

Vários autores têm descrito técnicas moleculares para a identificação de várias espécies de fungos, como *Candida* spp e *Aspergillus* spp. Ensaio baseados no DNA para detecção e identificação de espécies fúngicas fornecem uma alternativa altamente sensível e específica em relação aos métodos convencionais. As técnicas moleculares têm como uma das vantagens a capacidade de detecção da infecção fúngica, mesmo antes dos aparecimentos dos primeiros sinais clínicos, e por isso podem facilmente ser utilizadas no acompanhamento de pacientes de risco, como transplantados (Badiie et al., 2007).

1.2.1 Diagnóstico Molecular das Infecções Fúngicas

Devido ao aumento da incidência das infecções fúngicas nos pacientes imunocomprometidos, os pesquisadores tem focado no desenvolvimento de um método rápido e preciso utilizando técnicas moleculares, tanto o uso de hibridações com ácidos nucleicos como o uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento (Atkins e Clark, 2004). A PCR é uma técnica de amplificação de sequências específicas de DNA ou RNA pela extensão de oligonucleotídeos complementares às fitas do DNA ou RNA

(Alberts et al., 2002). É uma técnica rápida e altamente específica, utilizada para detecção de pequenas quantidades de DNA, podendo ser aplicada para detectar e identificar microorganismos de diferentes fontes, como solo, tecidos, sangue e escarro (Borneman et al., 2000).

No entanto existe a necessidade de uma padronização e simplificação dos métodos de extração do material gênico para que a técnica possa ser utilizada na rotina do laboratório clínico. Isso é importante para que haja a diminuição de riscos de contaminação da amostra, pois isso levaria a um resultado falso positivo. Esta etapa é de grande importância para a técnica molecular, entretanto, a mesma apresenta dificuldades quanto ao rompimento da parede celular fúngica, remoção da parte orgânica bem como a obtenção de um produto íntegro (Yeo e Wong, 2002).

Uma dificuldade no desenvolvimento de metodologias para a detecção molecular de fungos patogênicos é a falta de informação quanto à variabilidade nas sequências nucleotídicas usadas para a construção das sondas específicas (Montoyama et al., 2000). Em fungos, os genes que codificam para os RNAs ribossomais são constantemente utilizados para o desenvolvimento de reações de detecção molecular. Os genes ribossomais estão presentes em todos os organismos e em grande número de cópias, característica que contribui para o aumento da sensibilidade da PCR; além disso eles, eles são altamente conservados, diminuindo assim o risco de ampliações não-específicas (Bialek et al., 2002).

A unidade transcripcional dos genes ribossomais é composta por três genes, o da subunidade maior (25S ou 28S), da subunidade menor (18S) e o gene 5.8S, separados por regiões denominadas espaçadora interna transcritas,

(ITS1 e ITS2). O seguimento ITS é uma região de importância particular para o diagnóstico de fungos, por possuir regiões altamente conservadas e regiões altamente variáveis e tem sido o foco de muitos pesquisadores para a sua utilização na identificação de agentes causadores de infecções fúngicas (Turenne et al., 1999; Ferrer et al., 2001; Leaw et al., 2006; Borman et al., 2008; Wengenack e Binnicker, 2009; White et al., 2009).

Além das regiões espaçadora interna transcrita (ITS), outra região de bastante importância tem sido descrita: a região do espaço intergênico (*Intergenic spacer* (IGS) 1 e 2), localizado entre os genes da subunidade maior (25-28S) e da subunidade menor (18S). A região IGS tem sido sequenciada e utilizada para análise de variabilidade genética de várias espécies de fungos, como espécies do gênero *Trichosporon* (Diaz et al, 2004), *Mrakia* spp (Diaz et al, 2000), *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Phaffia rhodozyma* (Fell et al, 1999). Sugita e colaboradores (2002) analisaram as seqüências da região IGS e da região ITS de todos os membros do gênero *Trichosporon* e concluíram que a região IGS apresentou maior variabilidade que a região ITS, sendo aquela mais indicada para diferenciação filogenética em espécies de um mesmo gênero.

A PCR em tempo real tem revolucionado o diagnóstico de diversas patologias causadas pelos microrganismos pois combina a amplificação da técnica de PCR com marcadores fluoróforos, o que possibilita uma infinidade de combinações e resultados. Além disso, a PCR em tempo real é um método bastante rápido, reduzindo os custos de se manter os aparelhos para a detecção dos produtos finais (Espy et al., 2006). A identificação de microrganismos por PCR em tempo real busca trazer maior eficácia,

sensibilidade e especificidade ao resultado, podendo utilizar tanto o material genético obtido de culturas puras como também o uso de amostras clínicas, sem perda da sua eficiência.

A utilização da PCR em tempo real já vem sendo descrita para o uso em diagnóstico de infecções fúngicas (Bretagne e Costa, 2005). Schabereiter-Gurtner e colaboradores (2007) desenvolveram uma PCR em tempo real para identificação de *Aspergillus* spp. e *Candida* spp utilizando a região ITS2 do DNAr. No estudo, foram utilizados iniciadores universais e sondas específicas para cada uma das espécies estudadas, onde a diferenciação das mesmas foi realizada por diferenças na temperatura de dissociação (*melting curve*). A reação foi testada em amostras provenientes de cultura pura e clínicas, apresentando alta sensibilidade.

O sistema PCR em tempo real multiplex também foi explorado para a detecção e identificação do fungo de amostras de sangue de pacientes. O teste consistiu em uma amplificação inicial curta seguida por 12 PCRs simultâneos que tinha como alvo as regiões ITS1 e ITS2 do DNAr, o gene que codifica para o fator de alongação 1 e o gene que codifica para a tubulina. O resultado permitiu a identificação de 11 patógenos: *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* complexo, *C. tropicalis*, complexo *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium solani*, *Fusarium* spp e *Scedosporium prolificans*. A presença ou ausência do patógeno foi confirmada através da curva de dissociação (Lau et al., 2008).

As reações de PCR em tempo real podem variar quanto ao seu fluoróforo e aparelho, mas essencialmente mostram um resultado consistente de sensibilidade e especificidade, inferindo que a PCR em tempo real é

bastante útil na identificação entre diferentes fungos e entre as diferentes espécies de um mesmo gênero. No entanto, as técnicas preconizam o uso de sondas fluorescentes para a identificação dos mesmos.

1.2.2 Diagnóstico da Criptococose

O diagnóstico laboratorial da criptococose é baseado em três princípios: demonstração da levedura em amostras clínicas, isolamento do microrganismo em meios de cultura e isolamento de antígenos específicos circulantes (Caillot et al. 1997). A identificação direta do fungo pode ser realizada em amostras de líquido, escarro, lavado brônquico, urina, tecidos macerados e punção de medula óssea. Entretanto, o método mais indicado para o diagnóstico é a pesquisa do antígeno polissacarídeo circulante no soro e líquido através da prova de látex ou pela detecção de antígenos específicos dessa levedura obtida pela técnica imunoenzimática ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (Bivanco et al., 2006). Como diagnóstico auxiliar pode ser feito a prova intradérmica de leitura tardia utilizando a criptococcina, um antígeno peptídeo-polissacarídeo, obtida a partir do antígeno extraído por autoclavagem de culturas da levedura de *Cryptococcus* sp. em ágar Sabourand, não tipadas sorologicamente (Bivanco et al., 2006).

A técnica de PCR em tempo real tem sido considerada como o método molecular mais revolucionário, no diagnóstico de patógeno (Vollmer et al, 2008). É um dos métodos mais modernos aplicados no estudo da criptococose e, também, uma técnica rápida e precisa para a identificação de *C. neoformans* e *C. gattii* de culturas ou diretamente de amostras clínicas (Sidrim, 2010).

Adicionado a isso, a técnica tem sido amplamente utilizada para determinação da expressão de genes relacionados com fatores de virulência dos microrganismos (Epsy et al, 2006). Estudos comparativos têm mostrado que a PCR em tempo real é mais rápida que a reação de nested PCR, além daquela permitir uma análise quantitativa (Bialek et al, 2002). Hsu e colaboradores (2003) aplicaram a técnica para confirmação de espécies de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. com oligonucleotídeos espécie-específicos e concluiu que o método é altamente rápido e sensível na detecção de patógenos específicos.

1.3 Justificativa

Com o aumento no número de casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) nas últimas décadas, têm aumentado o número de casos de infecções causadas por fungos, fato este, aliado aos avanços da medicina moderna, que mantém os pacientes imunodebilitados por mais tempo nos hospitais e o uso de terapias imunossupressoras. Além do mais, o número de casos de infecções fúngicas é subestimado devido à carência de metodologias de identificação rápida e altamente sensível para esses agentes.

O diagnóstico das infecções causadas por fungos deve ser rápido, pois é fundamental para o tratamento adequado do paciente e tem um impacto profundo no prognóstico da doença. Com o advento das novas drogas antifúngicas, aumentou a perspectiva de controle dessas infecções. Entretanto, o diagnóstico é difícil, mas de grande importância para o início de uma terapia adequada, diminuindo assim a alta taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos.

O padrão ouro de detecção de infecções fúngicas é baseado na hemocultura; entretanto esta metodologia é lenta, exigindo entre 48 e 96 horas para posterior identificação, além de resultados falso negativos.

As técnicas moleculares caracterizam-se como um método rápido, altamente sensível e específico, sendo alvo de estudo de vários pesquisadores. É uma técnica capaz de detectar pequenas quantidades de DNA, podendo ser utilizada para a identificação de microrganismos em diferentes fontes, como solo, tecidos e fluidos biológicos. Entretanto, faz-se necessário amplo estudo para que essa metodologia seja utilizada em rotina de laboratório clínico.

A criptococose é a quarta principal causa de mortalidade e morbidade em pacientes imunodeprimidos, sendo considerada um caso de saúde pública. É uma infecção causada pelos fungos encapsulados *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*, que causa milhões de mortes por ano, em pacientes com o sistema imune debilitado. O quadro clínico apresentado por esses microrganismos difere entre si, sendo *C. neoformans* considerado como um patógeno oportunista, que acomete pacientes imunossuprimidos, enquanto que *C. gattii* pode ser considerado como um patógeno infeccioso, já que este acomete indivíduos imunocompetentes. Além disso, *C. gattii* causa um maior número de lesões de massa (criptococomas) no pulmão e no cérebro, o que geralmente necessitam de intervenções cirúrgicas, aliado ao fato de este apresentar uma maior resistência aos antifúngicos, quando comparado com *C. neoformans*.

A identificação de *C. gattii* e *C. neoformans*, na rotina clínica, é baseado na cultura do microrganismo, o que demanda um maior tempo no diagnóstico, bem como a presença de resultados falso-negativos.

Dentro das técnicas moleculares a reação de PCR em tempo real tem revolucionado o diagnóstico de diversas patologias. Esta alia a eficiência da PCR com a utilização de compostos fluorescentes, culminando em diversas possibilidades de resultados. Além disso, a técnica diminui o custo, pois não utiliza aparelhos para a detecção do produto final. Sendo assim, neste trabalho, foi proposto o desenvolvimento de uma PCR em tempo real para a identificação rápida e específica dos fungos *C. gattii* e *C. neoformans*.

1.4 Objetivos

Dentro das técnicas moleculares a reação de PCR em tempo real tem revolucionado o diagnóstico de diversas patologias. Esta alia a eficiência da PCR com a utilização de compostos fluorescentes, culminando em diversas possibilidades de resultados. Além disso, a técnica diminui o custo, pois não utiliza aparelhos para a detecção do produto final. Sendo assim, neste trabalho, foi proposto a padronização de uma PCR em tempo real para a identificação rápida e específica dos fungos *C. gattii* e *C. neoformans*. Para isso, os objetivos específicos foram:

- Análise por bioinformática dos genes de interesse;
- Análise da sensibilidade e especificidade dos iniciadores por PCR em tempo real;
- Infecção experimental em animais com os fungos *C. gattii* e *C. neoformans* para a obtenção de amostras amostra biológica;
- Detecção da infecção fúngicas dos animais por PCR em tempo real.

2 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Distinction between *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* using the rDNA IGS1 region by real time PCR

Diferenciação entre *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* usando a região IGS1 do rDNA por PCR em tempo real.

Eliandro Reis Tavares¹, Jussevania Pereira Santos¹, Suelen Balero de Paula¹, Luciano Aparecido Panagio¹, Phileo Pinge Filho², Emerson José Venâncio², Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹, Lucy Megumi Yamauchi^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia e ² Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, Campus Universitario, Londrina, Parana, CEP 86051-990, Brazil

* Corresponding author. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788. E-mail address: lionilmy@uel.br

Abstract

Cryptococcus is encapsulated yeast that causes high incidence of death among patients infected with human immunodeficiency virus (HIV); however it also has the ability to infect health people. Genetic studies separated *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in two human pathogenic species, due to their pathogenic characteristics, it is an important issue to understand their biology and be able to differentiate them. Here, we developed a single step real-time polymerase chain reaction for distinction between *C. neoformans* and *C. gattii* using the amplification of IGS1 region from ribosomal DNA. Specificity of both pairs of primers was analyzed by testing 10 different fungi DNA. The sensibility threshold was found about 10 yeasts per assay. The reactions were also tested in 14-day infected mice brain tissue, and we were able to differentiate both *Cryptococcus* species from 100 yeasts infected mice.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*; Differentiation; Real-time PCR.

Cryptococcus sp. é um microrganismo emergente, agente etiológico da criptococose, que acomete pacientes imunodeprimidos, decorrentes por infecção do vírus HIV ou por submissão à terapias imunossupressoras (McCarthy et al, 2006). A criptococose é uma doença oportunista que, após o advento da infecções por HIV, tem causado cerca de um milhão de novos casos por ano, resultando em mais de 620 mil mortes aproximadamente (Park et al, 2009). No Brasil, 6% dos pacientes identificados como portadores de HIV, entre 1980 e 2002, apresentaram um quadro de criptococose no momento do diagnóstico (Lea et al, 2008).

Estudos genéticos permitiram a classificação de *Cryptococcus* em 2 espécies distintas: *C. neoformans* e *C. gattii* (Kwon-Chung et al, 2002). *Cryptococcus neoformans* é o principal agente da criptococose, sendo responsável por 95% dos casos; entretanto, surtos causados por *C. gattii*, como no caso de Vancouver, tem despertado a atenção para esta levedura, pela sua capacidade de causar doença em indivíduos imunocompetentes (Kidd et al, 2004). Recentemente, estudos tem analisado e demonstrado diferenças significativas entre as duas espécies de leveduras, como a manifestação clínica e o tratamento, sugerindo que apenas o diagnóstico ao nível de gênero (*Cryptococcus*) não é suficiente, onde a diferenciação entre estas espécies devem ser realizadas para que haja uma diminuição da morbidade e mortalidade nesses pacientes (Byres III et al, 2011).

O diagnóstico da criptococose é baseado na identificação direta da levedura ou na detecção de antígenos através de testes imunoenzimáticos, como o teste de aglutinação em látex (Roy e Chiller, 2011). O teste de aglutinação em látex é, geralmente, usado em diagnósticos de meningite criptococcica, em amostras provenientes de punção lombar, sendo que o resultado pode fornecer um prognóstico do paciente (Diamond e Bennett, 1974). As técnicas moleculares, tais como sequenciamento, PCR e métodos baseados na PCR também têm sido utilizados para o diagnóstico da criptococose (Sidrim et al, 2010). O tempo reduzido e a alta sensibilidade apontaram a PCR em tempo real como uma técnica bastante útil, permitindo a detecção de patógenos e diferenciação entre espécies de um mesmo gênero, utilizando sondas ou por análise da curva de dissociação dos produtos

amplificados (Espy et al, 2006). Para o diagnóstico molecular de fungos, os alvos comumente utilizados são os genes que codificam para o RNA ribossomal. Estes são constituídos de quatro genes: o gene que codifica para a subunidade menor (18S), o gene que codifica para a subunidade 5.8S, o gene que codifica para a subunidade maior (25-28S) e o gene que codifica para a subunidade 5S, separadas pelas regiões internas transcritas (ITS) 1 e 2, e pelas regiões do espaço intergênico (IGS) 1 e 2 (Wengenack e Binnicker, 2009). Varias técnicas têm sido desenvolvidas para diagnosticar a criptococose (Sidrim et al, 2010) utilizando como alvo, as seqüências da região ITS, embora a análise das seqüências de DNA correspondente a esta região tem demonstrado que não há diferenças significativas para a distinção entre as duas espécies. Análises das seqüências de DNA das regiões IGS1 e IGS2 do complexo *Cryptococcus* demonstraram que a região IGS1 apresentou variabilidade genética, como inserções, deleções e substituições de bases nucleotídicas; a região IGS2, também apresentou heterogeneidade (Diaz et al, 2005). Sendo assim, neste estudo foi escolhida a região IGS1 para a diferenciação de espécies de *Cryptococcus* sp. por PCR em tempo real.

Inicialmente, foi realizado a busca e a análise de seqüências correspondentes à região IGS1, seqüências estas, disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com os seguintes códigos de acesso: *C. gattii* DQ007953, DQ007954, DQ007955, DQ007957, DQ007958, DQ007959, DQ007960, DQ007961, DQ007962, DQ007963, DQ007965, DQ007964; e *C. neoformans*: DQ007943, DQ007944, DQ007945, DQ007946, DQ007947, DQ007948, DQ007949, DQ007950, DQ009483. O resultado das análises das seqüências de ambas as espécies apresentaram seqüências consensos únicas para cada uma delas. A partir das seqüências consensos, foram delineados iniciadores específicos, denominados CgIGS1-F/R para *C. gattii* e CnIGS1-R/F para *C. neoformans*; ambos foram testados em DNA genômico obtidos de cultura pura de *C. gattii* (ATCC 56990) e *C. neoformans* (ATCC 66031), fornecidos pelo Laboratório de Microrganismos de Referência, Fundação Carlos Chagas.

Para a extração do material genômico, as leveduras foram ressuspensas em tampão de lise e rompidas por choque físico, seguido pela remoção da fase

orgânica pela adição de fenol/clorofórmio (Ausubel et al, 1999). O produto extraído foi quantificado por espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA) pela mensuração da absorbância a 260 nm e todas as amostras foram padronizadas para uma quantidade de 100ng/μL. Foram realizadas PCRs convencionais para cada um dos pares de oligonucleotídeos e as temperaturas de hibridação variaram entre 62°C e 72°C; o resultado das amplificações gerou um fragmento de 259 e 284 pares de bases para *C. gattii* e *C. neoformans*, respectivamente (dados não mostrados). Um reação de PCR em tempo real para determinar a sensibilidade dos iniciadores foi realizada em Rotor Gene 6000 (Corbet Research, Mortlake, Austrália), tendo como molde DNA das leveduras submetidas a diluições seriadas com uma variação correspondente entre 10⁶ e 10 células, 10 pMoles dos iniciadores e *Platinum SYBR green qPCR supermix-UDG* (Invitrogen, Nova York, EUA); a temperatura de hibridação escolhida foi de 70°C. Os resultados mostraram um limiar de detecção correspondente a 10 leveduras em ambos os fungos (Figura 1a e 1b). A eficiência da reação calculada a partir da inclinação da reta de regressão linear foi de 77 % (Slope=-4,093, R2=0,997) e 83% (Slope=-3,809, R2=0,999) para *C. gattii* e *C. neoformans*, respectivamente (Figura 1c). As curvas de dissociação de ambas as corridas foram geradas aumentando a temperatura em 0,5°C/segundo, iniciando em 60°C e parando em 95°C; os resultados mostraram 2 picos de dissociação: 82,8 °C e 84,2 °C para *C. gattii* e *C. neoformans*, respectivamente (figura 1d). As diferenças apresentadas nos fragmentos amplificados pelos iniciadores, mostradas a partir da análise da curva de dissociação, permitiram a distinção entre as duas leveduras. Não foram observados picos nas reações sem a adição de DNA molde, tidas como controle negativo.

Foi realizada outra PCR em tempo real para determinar a especificidade dos iniciadores, utilizando 100 ng de DNA por reação provenientes de 10 fungos diferentes (Tabela 1) e 1 humano. Os resultados mostraram a amplificação apenas para *C. gattii* e *C. neoformans*, utilizando os iniciadores específicos para cada uma das espécies. Não houve amplificação em nenhuma reação contendo DNA dos demais fungos, nem na reação contendo DNA humano. Os resultados mostram que a região escolhida, bem como os

iniciadores podem ser utilizados para a identificação das espécies estudadas. Para testar a eficiência dos iniciadores em amostras de tecidos, camundongos Swiss Webster foram infectados com ambas as espécies de *Cryptococcus* sp. com suspensão de leveduras contendo 100 células, e após 14 dias os animais foram sacrificados e os cérebros foram coletados para a realização do teste. Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com os princípios do Código Brasileiro para Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina (CEEA nº 07/2011). Os resultados mostraram uma amplificação específica (Figura 2), não havendo reatividade cruzadas observadas (dados não mostrados). De fato, os iniciadores delineados podem distinguir as duas espécies em uma única corrida de PCR em tempo real utilizando SYBR green.

Um estudo epidemiológico na América Latina mostrou que *C. neoformans* é a principal espécie encontrada em pacientes portadores de HIV; entretanto, *C. gattii* também tem sido isolado (Nucci et al, 2010). A incidência de *C. neoformans* como patógeno da criptococose é alto em pacientes portadores de HIV, entretanto *C. gattii* apresenta riscos para indivíduos saudáveis também (Lea et al, 2008; Mora et al, 2011). Dados publicados mostram que a incidência de *Cryptococcus gattii* é maior no norte-nordeste do Brasil, e *C. neoformans* é maior nas regiões sul e sudeste (Nishikawa et al, 2003; Santos et al, 2008, Matos et al, 2012). Esses relatos mostram que a rápida identificação do agente patogênico é necessária, e a PCR em tempo real satisfaz essa necessidade. A técnica de PCR em tempo real para a criptococose já havia sido desenvolvida, entretanto a mesma era incapaz de distinguir entre *C. gattii* e *C. neoformans* (Bergman et al, 2007; Veron et al, 2009).

Recentemente, uma técnica de PCR-REA foi desenvolvida para a diferenciação de ambos os fungos a partir de amostras humanas e veterinárias, que amplifica o gene CAP59, seguido por análise com enzimas de restrição; no entanto a existência de passos além da PCR aumentam o tempo e o custo do método (Cordeiro et al, 2011). A técnica, neste apresentada, é acessível, rápida e simples de ser utilizada em laboratórios de diagnóstico. No geral, o estudo mostrou que a amplificação da região IGS1 do rDNA por PCR em

tempo real combinados com análise da curva de dissociação é uma ferramenta para a diferenciação entre *C. gattii* e *C. neoformans*. A melhoria do diagnóstico com a identificação dos patógenos irá facilitar no início do tratamento de pacientes e monitoramento de doentes por criptococose.

Referencias

- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Short protocols in molecular biology. 4 ed. New York: John Wiley and Sons, 1999.
- Bergman A., Fernandez V., Holmstrom K.O., Claesson B.E.B. Enroth H. Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26: 813-818, 2007.
- Byrnes III E.J., Bartlett K.H., Perfect J.R., Heitman, J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. Microbes Infect. 13: 895- 907, 2011.
- Cordeiro R.A., Costa A.K.F., Brilhante R.S.N., Lima R.A.C., Castelo-Branco D.S.C.M., Ribeiro J.F., Monteiro A.J., Rocha F.A.C., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G. PCR-REA as an important tool for identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from human and veterinary sources. Vet. Microbiol. 154: 180-184, 2011.
- Diamond R.D., Bennett J.E. Prognostic factors in cryptococcal meningitis. A study in 111 cases. Ann. Intern. Med. 80: 176-181, 1974.
- Diaz M.R., Boekhout T., Kiesling T., Fell J.W. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res. 5: 1129-1140, 2005.
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill III F.R., Smith T.F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin. Microbiol. Rev. 19: 165-256, 2006.

- Kidd S.E., Hagen F., Tschärke R.L., Huynh M., Bartlett, K.H., Fyfe M., MacDougall L., Boekhout T., Kwon-Chung, K.J., Meyer, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Aca. Sci USA* 101: 17258-17263, 2004.
- Kwon-Chung K.J., Boekhout T., Fell J.W., Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51: 804-806, 2002.
- Leal A.L., Faganello J., Fuentefria A.M., Boldo J.T., Bassanesi M.C., Vainstein M.H. Epidemiological profile of Cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathol.* 166: 71-75, 2008.
- 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. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 2012 Jan 26. [Epub ahead of print], DOI: 10.1007/s10096-011-1488-3.
- McCarthy K.M., Morgan J., Wannemuehler K.A., Mirza S.A., Gould S.M., Mhlongo N., Moeng P., Maloba B.R., Crewe-Brown H.H., Brandt M.E., Hajjeh R.A. Population-based surveillance for cryptococcosis in an antiretroviral-naïve South African province with a high HIV seroprevalence. *AIDS* 20: 2199-2206, 2006.
- Mora D.J., Colombo E.R.C., Ferreira-Paim K., Andrade-Silva L.E., Nascentes G.A.N., Silva-Vergara M.L. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, *Mycopathol.* 2011 Dec 1. [Epub ahead of print], DOI: 10.1007/s11046-011-9504-9.
- Nishikawa M.M, Lazera M.S., Barbosa G.G., Trilles L., Balassiano B.R., Macedo R.C.L. Bezerra C.C.F., Perez M.A., Cardarelli P., Wanke B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J. Clin. Microbiol.* 41: 73–77, 2003.

- Nucci M., Queiroz-Telles F., Tobón A.M., Restrepo A., Colombo A.L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin. Infect. Dis.* 51: 561-570, 2010.
- Park B.J., Wannemuehler K.A., Marston B.J., Govender N., Pappase P.G., Chiller T.M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525-530, 2009.
- Roy M., Chiller T. Preventing deaths from cryptococcal meningitis: from bench to bedside. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9: 715-717, 2011.
- Santos W.R.A., Meyer W., Wanke B., Costa S.P.S.E., Trilles L., Nascimento J.L.M., Medeiros R., Morales B.P., Bezerra C.C.F., Macêdo R.C.L., Ferreira S.O., Barbosa G.G., Perez M.A., Nishikawa M.M., Lazéra M.S. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103: 813-818, 2008.
- Sidrim J.J.C., Costa A.K.F., Cordeiro R.A., Bilhante R.S.N., Moura F.E.A., Souza D., Castelo-Branco C.M., Araújo Neto M.P., Rocha M.F.G. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can. J. Microbiol.* 56: 445-458, 2010.
- Veron V., Simon S., Blanchet D., Aznar C. Real-time polymerase reaction detection *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in human samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65: 69-72, 2009.
- Wengenack N.L., Binnicker M.J. Fungal Molecular Diagnostics. *Clin. Chest Med.* 30; 391-408, 2009.

Tabela 1. Especificidade dos oligonucleotídeos CnIGS1-F/R e CgIGS1-F/R por PCR em tempo real.

Microorganism	Strain	CnIGS1-F/R	CgIGS1-F/R
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Fiocruz ATCC 66031	Positive	Negative
<i>Cryptococcus gattii</i>	Fiocruz ATCC 56990	Negative	Positive
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Pb18	Negative	Negative
<i>Histoplasma capsulatum</i>	IMT/HC128	Negative	Negative
<i>Candida albicans</i>	Fiocruz ATCC 26790	Negative	Negative
<i>Candida tropicalis</i>	Fiocruz ATCC 28707	Negative	Negative
<i>Candida dubliniensis</i>	Fiocruz ATCC MYA-646	Negative	Negative
<i>Candida famata</i>	Fiocruz ATCC 62894	Negative	Negative
<i>Sporotrix schenckii</i>	Clinical isolate	Negative	Negative
<i>Trichophyton rubrum</i>	Clinical isolate	Negative	Negative

Legendas

Figura 1. Análise da sensibilidade de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* por PCR em tempo real. Gráficos da amplificação de diluições seriadas de DNA de leveduras equivalentes (Correspondentes entre 10^6 -10 leveduras) de DNA de *C. gattii* (a) e *C. neoformans* (b). Curva padrão gerada após a regressão linear com o Ct *versus* o número de leveduras. Análise da curva de dissociação: *C. gattii*, *C. neoformans* e amostras tidas como controle negativo (NTC) (d); o pico de temperatura de dissociação é indicada (T_m).

Figura 2. Detecção de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* em amostras biológicas. Os animais foram infectados com 100 leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii* e após 14 dias, foram sacrificados e o cérebro foram utilizados para extração de DNA e submetidos à PCR em tempo real, utilizando ambos os iniciadores.

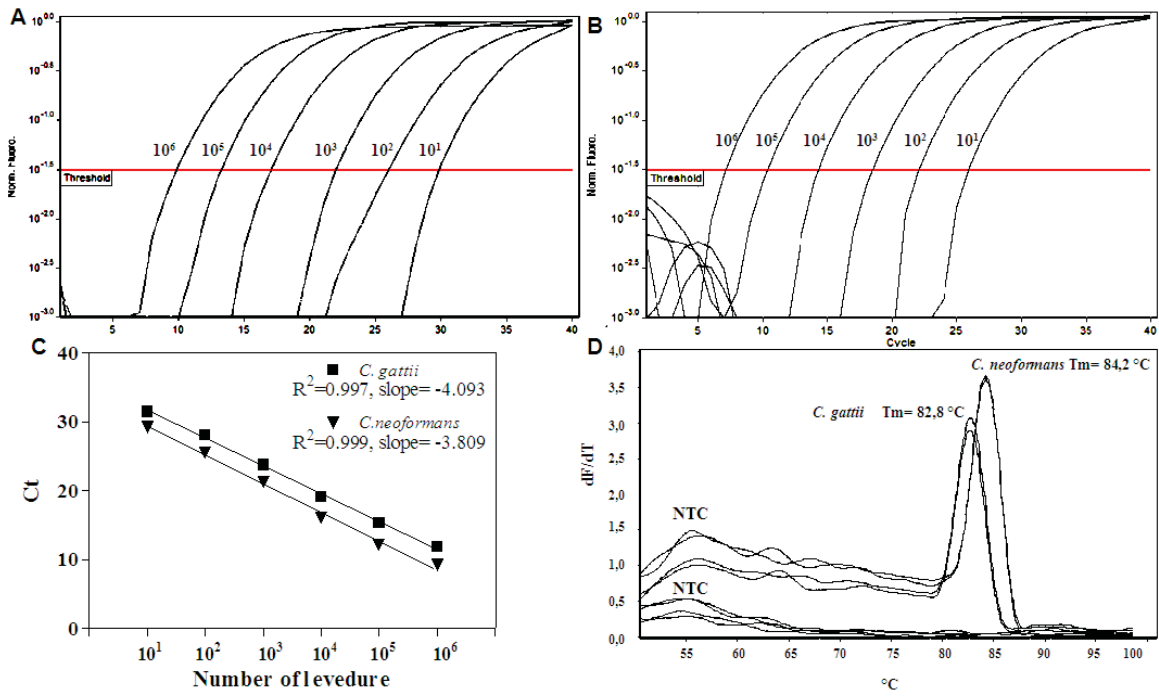


Figura 1. Tavares et al, 2012.

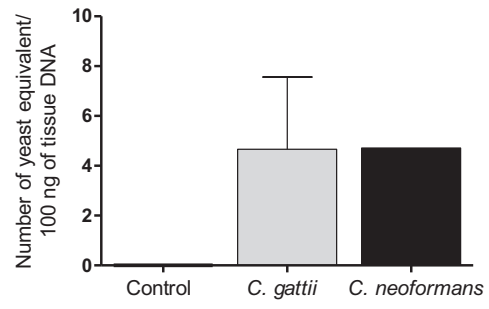


Figura 2. Tavares et al, 2012.

3 CONCLUSÃO

Em conclusão, a análise das sequências correspondentes à região IGS1 apresentou resultados satisfatórios, onde estas mostraram polimorfismo suficiente para que fossem delineados os iniciadores específicos para cada uma das duas espécies estudadas: *C. gattii* e *C. neoformans*. Quando comparadas com sequências de outras espécies de fungos, como *Candida* spp. aquelas não apresentaram identidade, ou seja, não houve reatividade cruzada.

Os oligonucleotídeos desenhados apresentaram resultados específicos para as suas espécies respectivas (*C. gattii* e *C. neoformans*), permitindo a diferenciação entre as duas espécies. A sensibilidade dos mesmos foi de 10 células leveduriformes. Para o teste em amostras de cérebro, os resultados mostraram que a reação é capaz de detectar a presença das leveduras em amostras biológicas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4ed, Nova York e Londres: Garland Science, 2002.
- ALBUQUERQUE, U.P.; CAVALCANTI, L.H.; CABALLERO, J. Structure and Floristics of Homegardens in Northeastern Brazil. **J. Arid. Envir.** 62(3): 491-506, 2005.
- ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal Molecular Diagnostics: a Mini Review. **J. Appl. Genet.** 45(1): 3-15, 2004
- BADDLEY, J.W.; STROUD, T.P.; SALZMAN, D.; PAPPAS, P.G. Invasive Mold Infections in Allogeneic Bone Marrow Transplant Recipients. **Clin. Infect. Dis.** 32: 1319-1324, 2001.
- BADIEE, P.; KORDBACHEH, P.; ALBORZI, A.; MALEKHOSEINI, S.; ZEINI, F.; MIRHENDI, H.; MAHMOODI, M. Prospective Screening in Liver Transplant Recipients by Panfungal PCR-ELISA for Early Diagnosis of Invasive Fungal Infections. **Liver Transplan.** 13(7): 1011-1016, 2007.
- BIALEK, R.; WEISS, M.; BEKURE-NEMARIAM, K.; NAJVAR, L.K.; ALBERD, M.B.; GRAYBILL, J.R.; REISCHL, U. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in Tissue Samples by Nested and Real-Time PCR Assays. **Clin. Diag. Labor. Immunol.** 9(2): 461 – 469, 2002.
- BIVANCO, F.C., MACHADO, C.D.S.; MARTINS, E.L. Criptococose Cutânea. **Arq. Méd. ABC.** 31(2):102-109, 2006.
- BORMAN, A.M.; LINTON, C.J.; MILES, S.; JOHNSON, E.M. Molecular Identification of Pathogenic Fungi. **J. Antimicrobial Chemotherapy.** 61: 7-12. 2008.

- BORNEMAN, J.; HARTIN, R.J. PCR Primers that Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. **Appl. Environ. Microbio.** 66: 4356-4360, 2000.
- BRETAGNE, S.; COSTA, J.M. Towards a Molecular Diagnosis of Invasive Aspergillosis and Disseminated Candidosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 45: 361 – 368, 2005.
- BYRNES III, E.J.; BARTLETT, K.H.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii*: an Emerging Fungal Pathogen Infecting Humans and Animals. **Micr. and Infec.** 13: 895 – 907, 2011.
- CAILLOT, D.; CASASNOVAS, O.; BERNARD, A.; COVAILLIER, J.; DURAND, C.; CUISENIER, B.; SOLARY, E.; PIARD, F.; PETRELLA, T.; BONNIN, A.; COVILLAULT, G.; DUMAS, M.; GUY, H. Improved Management of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Neutropenic Patients Using Early Thoracic Computed Tomographic Scan and Surgery. **J. Clin. Oncol.** 15(1): 139–147, 1997.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Library of Congress: Washington, 1998.
- CASALI, A.K.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans*: Aspectos Moleculares e Epidemiológicos. **Biotec. Cienc. e Desenvol.** 34-37, 2001.
- CASTÓN, J.J.; LINARES, M.J.; GALLEGU, C.; RIVERO, A.; FONT, P.; SOLÍS, F.; CASAL, M.; TORRE-CISNEROS, J. Culture for Filamentous Fungi *Terreus* Infection in Patients with Positive Risk Factors for Pulmonary *Aspergillus*. **Chest.** 131: 230-236, 2007.
- CLARK, T.A.; HAJJEH, R.A. Recent Trends in the Epidemiology of Invasive Mycoses. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 15: 569-574, 2002
- COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUE'R, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. For the

- Brasilian Network Candidemia Study. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **J. Clin. Microbiol.** 44: 2816-2823, 2006
- DENNING, D.W.; KIBBLER, C.C.; BARNES, R.A. British Society for Medical Mycology Proposed Standards of Care for Patients with Invasive Fungal Infections. **Lancet. Infect. Dis.** 3:230-240, 2003.
- DIAZ, M.R.; FELL, J.W. Molecular analyses of the IGS & ITS regions of rDNA of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia*. **Antonie van Leeuwenhoek.** 77: 7 – 12, 2000.
- EINSELE, H., HEBART, H., ROLLER, G. LÖFFLER, J.; ROTHENHÖFER, I.; MÜLLER, C.A.; BOWDEN, R.A.; VAN BURIK, J.; ENGELHARD, D.; KANS, L.; SCHUMACHER, U. Detection and Identification of Fungal Pathogens in Blood by Using Molecular Probes. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1353–1360, 1997.
- ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti*. **J. Clin. Microbiol.** 28(7): 1642-1644, 1990.
- ESPY, M.J.; UHL., J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER, E.A.; YAO, J.D.C.; WENGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL, F.R.; SMITH, T.F. Real-time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clin. Microbiol. Rev.** 19: 165 – 256, 2006.
- FELL, J.W.; BLATT, G.M. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 23: 677 – 681, 1999.
- FERNANDES, O.F.L., COSTA, T.R., COSTA M.R., SOARES, A.J., PEREIRA, A.J.S.C.; SILVA, M.R.R. *Cryptococcus neoformans* Isolados de Pacientes com AIDS. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33(1): 75-78, 2000.

- FERRER, C.; COLOM, F.; FRASÉS, S.; MULET, E.. ABAD, J.L. ALIÓ, J.L. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **J. Clin. Microbiol.** 39: 2873 – 2879, 2001.
- GOLDMAN, J.D.; VOLLMER, M.E.; LUKS, A.M. Cryptococcosis in the Immunocompetent Patient. **Resp. Care.** 55(11): 1499 – 1503, 2010.
- HATTORI, H.; INOUE, C.; TOMITA, Y.; KANBE, T. A Case of Oral Geotrichosis Caused by *Geotrichum capitatum* in an Old Patient. **Jpn. J. Infec. Dis.** 60: 300-301, 2007.
- HONSHO, C.S., MINE, S.Y., ORIÁ, A.P., BENATO, N., CAMACHO, A.A., ALESSI, A.C.; LAUS, J.L. Generalized Systemic Cryptococcosis in a Dog After Immunosuppressive Corticotherapy. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 55(2):155-159, 2003.
- HOPE W. W., WALSH T. J., DENNING D. W. Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis. **Lancet. Infec. Dis.** 5: 609-622, 2005
- HSU, M-C.; CHEN, K-W.; LO, H-J.; CHEN, Y-C.; LIN, Y-H.; LI, S-Y. Species Identification of Medically Important Fungi by use of Real-time LightCycler PCR. **J. Med. Microbiol.** 52:1071 – 1076, 2003.
- IKEDA, R.; NISHIKAWA, A.; SHINODA,T.; FUKAZAWA, Y. Chemical Characterization of Polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* Serotype A-D. **Microbiol. Immunol.** 29(10): 981-991, 1985.
- KĘDZIERSKA, A.; KOCHAN, P.; PIETRZYK, A.; KĘDZIERSKA, J. Current Status of Fungal Cell wall Components in the Immunodiagnosics of Invasive Fungal Infections in Humans: Galactomannan, Mannan and (1→3)-β-D-glucan Antigens. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 26: 755 – 766, 2007.

- KWON-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W.; DIAZ, M. Proposed to Conserve the Name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus*. **Taxon**, 51: 804-806, 2002.
- LARSSON, C.E.; OTSUKA, M., MICHALANY, N.S.; BARROA, P.S.M.; GAMBALE, W.; SAFATLE, A.M.V. Canine Ocular Cryptococcosis: a Case Report. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 55(5): 533-538, 2003.
- LAU, A.; SORRELL, T.C.; CHEN, S.; STANLEY, K.; IREDELL, J.; HALLIDAY, C. Multiplex Tandem PCR: a Novel Platform for Rapid Detection and Identification of Fungal Pathogens From Blood Culture Specimens. **J. Clin. Microbiol.** 46: 3021 - 3027, 2008.
- LEAW, S.N.; CHANG, H.C.; SUN, H.F.; BARTON, R.; BOUCHARA, J.P. CHANG, T.C. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. **J. Clin. Microbiol.** 44: 693 – 699, 2006.
- LOULERGUE, L.F.; PARRENIN, T.; BLUNIER, J.M.; BARNOLA, R.; SPAHNI, A.; SCHILT, G.; RAISBECK, J.; CHAPPELLAZ. New Constraints on the Gas Age-ice Age Difference Along the EPICA Ice Cores, 0-50 kyr. **Clim. of the Past.** 3(4): 527-540, 2007.
- MALIK, R.; WIGNEY, D.I.; MUIR, D.B.; LOVE, D.N. Asymptomatic Carriage of *Cryptococcus neoformans* in the Nasal Cavity of Dogs and Cats. **J. Med. Vet. Mycol.**, 35(1):25-31, 1997.
- MANZONI, P.; FARINA, D.; LEONESSA, M.; D'OULX, E.A.; GALLETTO, P.; MOSTERT, M.; MINIERO, R.; GOMIRATO, G. Risk Factors for Progression to Invasive Fungal Infection in Preterm Neonates with Fungal Colonization. **Pediatr.** 118: 2359-2364, 2006
- MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. **J. Clin. Microbiol.** 45(10): 3198-3206, 2007.

- MONTOYAMA, A.B.; VENANCIO, E.J.; BRANDÃO, G.O.; PETROFEZA-SILVA, S.; PEREIRA, I.S.; SOARES, C.M.A.; FELIPE, M.S.S. Molecular Identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR Amplification of Ribosomal DNA. **J. Clin. Microbiol.** 38(8): 3106-3109, 2000.
- PAGANO, L.; CAIRA, M.; VALENTINI, C.A.; POSTERARO, B.; FIANCHI, L. Current Therapeutic Approaches to Fungal Infections in Immunocompromised Hematological Patients. **Blood Rev.** 24: 51 – 61, 2010
- PASQUALOTTO, A.C.; SUKIENNIK, T.C.T.; SEVERO, L.C.; AMORIM, C.S.; COLOMBO, A.L. An Outbreak of *Pichia Anomala* Fungemia in a Brazilian Pediatric Intensive Care Unit. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** 26: 553-558, 2005.
- PEREIRA, A.P.C.; COUTINHO, S.D.A. Criptococose em Cães e Gatos – revisão. **Rev. Clin. Vet.** 8(45): 24-32. 2003.
- PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Criptococcosis. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** 16(4): 837 – 874, 2002.
- POETA, M.D.; CASADEVALL, A. Ten Challenges on *Cryptococcus* and Criptococcosis. **Mycopathol.** 2011.
- REOLON, A., PEREZ, L.R.R., MEZZARI, A.; Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos Pombos Urbanos da Cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **J. Bras. Patol. Med. Labor.** 40(5): 293-298, 2004.
- RODRIGUES, M.L.; ALVIANO, C.S.; TRAVASSOS, L.R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: Virulences Factors and Immunological Mechanisms. **Microb. Infect.** 1:293-301, 1999.
- SCHABEREITER-GURTNER,C.; SELITSCH, B.; ROTTER,M.L.; HIRSCHL, A.M.; WILLINGER, B. Development of Novel Real-time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and

- Candida* Species in Clinical Specimens. **J. Clin. Microbiol.** 45: 906–914, 2007.
- SEVERO, C.B.; GUAZZELLII, L.S.; SEVERO, L.C. Zigomicose. **J. Brás. de Pneumol.** 36(1):134-141, 2010.
- SEVERO, C.B.; GAZZONI, A.F.; SEVERO, L.C. Criptococose Pulmonar. **J. Bras. Pneumol.** 35(11): 1136-1144, 2009.
- SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; LONDERO, A.T. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian Patients with AIDS. Report of three cases. **Rev. Iberoam. Micol.** 16: 152-154, 1999.
- SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; SILVA, V.B. Diferenças Clínicas, Epidemiológicas e Ecológicas entre as duas Variedades de *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Méd. Sta Cas. Porto Alegre.** 9(16): 1672-1686, 1998.
- SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med. Mycol.** 39: 155-168.
- SIACHOQUE, N.; JEWUCHOWICZ, V.M.; IOVANNITTI, C.; MUJICA, M.T. Amplificación del Gen *CAP59* en *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* Directamente a partir de uma Suspensión de Levaduras. **Rev. Arg. Microbiol.** 42: 91 – 94, 2010.
- SIDRIM, J.J.C.; COSTA, A.K.F.; CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.N.; MOURA, F.E.A.; SOUZA, D.; CASTELO-BRANCO, C.M.; ARAÚJO NETO, M.P.; ROCHA, M.F.G. Molecular Methods for the Diagnosis and Characterization of *Cryptococcus*: a Review. **Can. J. Microbiol.** 56: 445 – 458, 2010.
- SUGITA, T.; NAKAJIMA, M.; IKEDA, R.; MATSUSHIMA, T.; SHINODA, T. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. **J. Clin. Microbiol.** 40(5): 1826 – 1830, 2002.
- TABOADA, J. Micoses Sistêmicas, p.478-503. In: ETTINGER S.J.; FELDMAN E.C. (eds.). Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato. 5. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

- TAYLOR, M.L.; CHÁVES-TAPIA, C.B.; VARGAS-YAÑEZ, R.; RODRÍGUES-ARELLNES, G.; PEÑA-SANDOVAL, G.R.; TORIELLO, C.; PÉREZ, A.; REYES-MONTES, M.R. Environmental Conditions Favoring Bat Infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican Shelters. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61(6): 914-919, 1999.
- TURENNE, C.Y.; SANCHE, S.E.; HOBAN, D.J.; KARLOWSKY, J.A. KABANI, A.M. Rapid Identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary Electrophoresis System. **J. Clin. Microbiol.** 37: 1846 – 1851, 1999.
- VOLLMER, T.; STÖRMER, M.; KLESSIEK, K.; DREIER, J. Evaluation of Novel Broad-Range Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Human Pathogenic Fungi in Various Clinical Specimens. **J. Clin. Microbiol.** 46(6): 1919 – 1926, 2008.
- WENGENACK N.L. BINNICKER, M.J. Fungal Molecular Diagnostics. **Clin. Chest Med.** 30: 391–408, 2009.
- WHEAT, L.J. Approach to the Diagnosis of the Endemic Mycoses. **Clin. Chest Med.** 30: 379 – 389, 2009.
- WHITE, P.L.; PERRY, M.D.; BARNES, R.A.. An Update on the Molecular Diagnosis of Invasive Fungal Disease. **FEMS Microbiol. Lett.** 296: 1 – 10, 2009.
- XAVIER, M.O.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Diagnóstico Laboratorial das Micoses Pulmonares. **J. Bras. Pneumol.** 35(9): 907-919, 2009.
- YEO, S.F.; WONG, B. Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. **Clin. Microbiol. Rev.** 15: 465 – 484, 2002.