

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Maria da Luz Martins

**Polimorfismos Fenéticos
e Diagnóstico Molecular
de *Cryptococcus neoformans***

Lisboa
2001

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Polimorfismos Fenéticos e Diagnóstico Molecular
de
Cryptococcus neoformans

Maria da Luz Marques Martins

*Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor
no Ramo de Ciências Biomédicas Tropicais,
Especialidade de Microbiologia pela
Universidade Nova de Lisboa,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical*

ORIENTADOR:

*Professora Doutora Isabel Spencer Martins
Professora Catedrática da Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa*

Lisboa - 2001

ÍNDICE DE MATÉRIAS

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
ÍNDICE DE MATÉRIAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxi
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. TAXONOMIA E ECOLOGIA DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	3
1.2. FACTORES DE VIRULÊNCIA.....	14
1.2.1 A Cápsula Polissacarídea.....	15
1.2.2 Produção de Pigmento.....	16
1.2.3 Actividades Enzimáticas.....	17
1.2.4 Termotolerância.....	18
1.2.5 <i>Mating-Type</i>	19
1.3. EPIDEMIOLOGIA DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	20
1.3.1 Ocorrência e Incidência da Infecção.....	20
1.3.2 As Variedades de <i>Cryptococcus neoformans</i>	22
1.3.3 Manifestações Clínicas da Criptococose.....	24
1.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	25
1.4.1 Exame Directo.....	25
1.4.2 Detecção do Antígeno Criptocócico.....	26
1.4.3 Isolamento em Cultura e Identificação.....	27
1.4.4 Outros Métodos de Diagnóstico.....	29
1.5. OBJECTIVOS DO TRABALHO E PLANO DA DISSERTAÇÃO.....	29
CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>.....	33
2.1. INTRODUÇÃO.....	35
2.1.1 Caracterização Morfológica.....	36
Macromorfologia.....	36
Micromorfologia.....	36
2.1.2 Caracterização Fisiológica.....	38
Características nutricionais.....	38
Termotolerância.....	39
Outras condições de cultura.....	40
2.1.3 Caracterização Bioquímica.....	41
Composição e reactividade da cápsula.....	41
Serologia.....	43
Teste CGB.....	45

Melanização.....	45
Teste da urease.....	46
Actividade proteolítica.....	47
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
2.2.1 Origem das Estirpes Estudadas.....	49
2.2.2 Isolamento, Identificação e Manutenção das Estirpes.....	50
2.2.3 Caracterização Morfológica.....	50
2.2.4 Caracterização Fisiológica.....	52
Testes convencionais.....	52
Temperatura máxima de crescimento.....	53
Sensibilidade à L-canavanina e assimilação de glicina (teste CGB).....	53
2.2.5 Caracterização Bioquímica.....	53
Serotipagem.....	53
Produção de pigmento.....	54
Produção de urease.....	54
Actividade proteolítica.....	54
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
2.3.1 Caracterização Morfológica.....	56
2.3.2 Caracterização Fisiológica.....	58
Testes convencionais.....	58
Temperatura máxima de crescimento.....	60
Teste CGB.....	63
2.3.3 Caracterização Bioquímica.....	65
Determinação dos serotipos.....	65
Produção de pigmento.....	67
Produção de urease.....	70
Actividade proteolítica.....	71
CAPÍTULO 3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>CRYPTOCOCCUS</i>	
 <i>NEOFORMANS</i>.....	77
3.1. INTRODUÇÃO.....	79
3.1.1. Caracterização e Identificação Molecular de <i>Cryptococcus neoformans</i>	79
Análise comparativa do genoma total.....	80
Sequenciação de regiões da unidade do DNA ribossómico.....	82
Outros métodos.....	84
3.1.2. Variabilidade Intraspecífica em <i>Cryptococcus neoformans</i>	85
Polimorfismos de regiões microssatélites.....	86
Polimorfismos de restrição (RFLP) da região IGS do rDNA.....	87
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
3.2.1. Estirpes Estudadas.....	89
3.2.2. Extracção e Purificação de DNA.....	89
Extracção rápida de DNA para PCR.....	90
Extracção de DNA para análise do genoma total.....	90
3.2.3. Amplificação por PCR com <i>Primer</i> Específico.....	92
3.2.4. Análise Comparativa do Genoma Total.....	94
Determinação do conteúdo em guanina e citosina (%mol G+C).....	94
Reassociação DNA-DNA.....	95
3.2.5. Sequenciação da Região D1/D2 do Gene da Subunidade 26S do RNA Ribossómico.....	96
3.2.6. Análise da Variabilidade Intraspecífica.....	98
Polimorfismos de regiões microssatélites (MS-PCR).....	98
Polimorfismos de restrição da região IGS do DNA ribossómico.....	99
3.2.7. Análise Numérica.....	100
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102

3.3.1. Identificação Molecular de Isolados Clínicos de <i>Cryptococcus neoformans</i>	102
Utilização de um <i>primer</i> específico.....	102
Validação do método utilizado.....	103
Sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S.....	107
3.3.2. Variabilidade Intraspecífica.....	110
Polimorfismos de regiões microssatélites (MS-PCR).....	110
Polimorfismos de restrição de regiões variáveis do DNA ribossómico.....	115
CAPÍTULO 4. DETECÇÃO DIRECTA DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i> EM AMOSTRAS CLÍNICAS.....	121
4.1. INTRODUÇÃO	123
4.1.1. Métodos de Detecção Directa Baseados em PCR.....	123
4.1.2. Hibridação <i>In Situ</i>	126
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	132
4.2.1. Método de Detecção Directa Baseado em PCR.....	132
Contaminação <i>in vitro</i> de amostras clínicas com <i>Cryptococcus neoformans</i>	132
Extracção de DNA de amostras clínicas.....	132
Detecção de <i>Cryptococcus neoformans</i> em amostras clínicas por PCR.....	134
4.2.2. Hibridação <i>In Situ</i> para Detecção Directa de <i>Cryptococcus neoformans</i>	135
Seleção da sequência-alvo, desenho e marcação da sonda.....	135
Preparação das células.....	135
Optimização das condições de hibridação.....	137
Ensaio de hibridação <i>in situ</i>	137
Observação ao microscópio.....	139
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	140
4.3.1. Método de Detecção Directa Baseado em PCR.....	140
4.3.2. Hibridação <i>In Situ</i>	143
CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	149
5.1. AS VARIEDADES DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	151
5.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA CRIPTOCOCOSE.....	157
5.3. AVALIAÇÃO DIRECTA DA PRESENÇA DE <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	159
5.4. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163
APÊNDICE.....	191

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. TAXONOMIA E ECOLOGIA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Cryptococcus neoformans foi pela primeira vez considerado como fungo patogénico para humanos em 1894 (Fig. 1.1). Atribui-se a primeira descrição de uma criptococose a dois patologistas alemães, Busse e Buschke, que observaram uns ‘corpúsculos’ redondos a ovais no material retirado de uma lesão da tíbia de uma doente (Busse 1894). A doente veio a falecer com uma infecção disseminada, mas Busse obteve uma cultura pura a partir desse material e, pensando tratar-se de um *blastomiceta*, designou o fungo por *Saccharomyces hominis* e a infecção correspondente por ‘*saccharomycosis hominis*’ (Busse 1895). Por outro lado, Buschke, o clínico responsável pela doente, descreveu o microrganismo como sendo um *coccidium* (Buschke 1895). No mesmo ano, em Itália, Sanfelice isolou uma levedura encapsulada a partir de sumo de pêsego fermentado e deu-lhe o nome de *Saccharomyces neoformans*, estabelecendo assim a prioridade taxonómica do epíteto de espécie *neoformans* (Sanfelice 1894). Posteriormente, reconheceu a semelhança entre *S. neoformans* e o fungo de Busse. Pela mesma altura, o patologista francês Curtis descreveu um caso de meningite criptococócica ao observar um doente com um tumor subcutâneo inguino-crural que veio a morrer com ‘*acidentes meningíticos de natureza mal determinada*’ (Curtis 1895). Do tumor isolou um microrganismo que observou ser uma levedura com uma cápsula ‘*gelificada transparente e incolor*’. Confirmou a sua patogenicidade inoculando-a em cobaias que vieram a desenvolver lesões tumorais idênticas às do doente. Curtis e Giard denominaram o agente etiológico de *Saccharomyces tumefaciens*.

Em 1901, Vuillemin transferiu os fungos de Busse e de Sanfelice para o género *Cryptococcus* designando-os por *C. hominis* e *C. neoformans*, respectivamente, porque estes fungos não fermentavam açúcares nem formavam ascósporos como as espécies do género *Saccharomyces* (Vuillemin 1901). O nome *Cryptococcus* tem origem na palavra grega *kryptos*, que significa escondido, e tinha sido criado por Kützing para designar o grupo de leveduras às quais faltava a capacidade para produzir endósporos (Kützing 1833).

Em Massachusetts, em 1902, Frothingham isolou, a partir de uma lesão pulmonar de um cavalo, uma levedura semelhante ao fungo observado por Busse e Buschke. Esta observação, em conjunto com o isolamento da levedura a partir de lesões de um boi, mostrou que o fungo também causava infecção nos animais. Foi sugerido ser provável que nestes a infecção fosse endógena, não encontrando motivos para que tivesse havido transmissão animal-homem (Crone *et al.* 1937, Conant *et al.* 1944).

Em 1916, Stoddard e Cutler referiram dois casos de meningite devida a um fungo que denominaram *Torula histolytica* (Benham 1934). Interpretaram a presença da cápsula fúngica como uma evidência da acção histolítica do fungo nos tecidos do hospedeiro. Infelizmente, o nome da doença, torulose, que derivou desta interpretação incorrecta, persistiu na literatura até à década de 50 (Benham 1950, Swinne 1979a).

Quase duas décadas depois, Benham estudou 22 estirpes de *Cryptococcus*, patogénicas e não patogénicas, isoladas do corpo humano. Essas estirpes, que incluíam os isolados de Busse e Curtis, tinham sido anteriormente classificadas por outros autores em três géneros distintos: *Cryptococcus*, *Saccharomyces* e *Torula*. Com base nos padrões morfológicos das colónias, testes de fermentação e assimilação, patologia e serologia sugerem então que todos os isolados humanos pertenciam provavelmente à mesma espécie, *Cryptococcus hominis*, e que esta espécie poderia ter duas variedades que se distinguem pela virulência e por características antigénicas (Benham 1935, Swinne 1979b).

Em 1949, Skinner propôs classificar no género *Cryptococcus* todas as leveduras não fermentativas e no género *Torulopsis* as leveduras fermentativas. Paralelamente, Evans encontrou diferenças serológicas entre estirpes isoladas de doentes com criptococose e veio a identificar os três primeiros serotipos: A, B e C (Evans 1949, *idem* 1950, Evans & Kessel 1951). Cerca de 20 anos mais tarde foi identificado o quarto serotipo (D), numa estirpe estudada por Vogel (1966). A existência deste último serotipo foi confirmada num número maior de isolados por Wilson *et al.* (1968).

Só em 1950 Benham propôs que o nome criptococose substituísse o de torulose e o de outras designações pelas quais a infecção era igualmente conhecida, como Blastomicose Europeia ou Doença de Busse-Buschke, e que *Cryptococcus neoformans* passasse a ser um *nomen conservandum* (Benham 1950). Lodder e Kreger-van Rij (1952) aceitaram esta

proposta no tratado que editaram sobre taxonomia das leveduras e *Cryptococcus neoformans* passou a representar o agente etiológico da criptococose.

Durante a década de 50 Emmons fez numerosos isolamentos de *C. neoformans* a partir de fontes ambientais. Começou por isolar o fungo a partir de amostras de solo em Virgínia (E.U.A.) e observou que os isolados virulentos desta espécie eram mais abundantes nos ninhos de pombos e nos seus excrementos (Emmons 1951, *idem* 1952, *idem* 1955). Foi também na mesma altura que Seeliger introduziu o teste da urease para a identificação de *Cryptococcus* (Seeliger 1956). Uns anos mais tarde, Staib (1962) descobriu que *C. neoformans* produzia colónias castanhas quando se multiplicava num meio contendo *Guizotia abyssinica* (sementes de Niger). O agar de sementes de Niger (Agar de Staib) tornou-se então o meio selectivo mais vulgarmente usado para o isolamento e identificação de *C. neoformans*.

Algumas estirpes de *C. neoformans* evidenciaram produção de hifas com ansas de anastomose (Shadomy & Utz 1966). Esta observação, indicadora de características sexuadas, foi o ponto de partida para a pesquisa do teleomorfo desta levedura.

Vanbreuseghem e Takashio (1970) estudaram uma estirpe atípica de *C. neoformans* isolada por Gatti e Eeckels (1970) que produzia, para além de células redondas, células alongadas e baciliformes. Sugeriram tratar-se de uma nova variedade que designaram de *C. neoformans* var. *gattii*. No entanto, esta nova variedade não foi aceite senão quando os estudos de cruzamentos entre estirpes a confirmaram (Kwon-Chung *et al.* 1982a, Schemeding *et al.* 1981).

O ciclo de vida completo de *C. neoformans* só foi conhecido em 1975. Kwon-Chung descobriu que o fungo existia sob dois tipos sexualmente compatíveis (a e α) que, quando cruzados, produziam um basidiomiceta teleomórfico (Kwon-Chung 1975, *idem* 1976a). A forma perfeita foi incluída no género *Filobasidiella*. Consequentemente, a descoberta do heterotalismo em *C. neoformans* permitiu o desenvolvimento de estudos sobre a sua genética.

A incidência da criptococose começou a aumentar significativamente nos finais dos anos 70. Começou a ser referido um número cada vez maior de casos e esta infecção deixou de ser rara. Muitos casos surgiram em consequência de complicações resultantes de terapêuticas imunossupressivas no tratamento de doenças neoplásicas, doenças auto-

imunes e em transplantes de órgãos. Reconhecendo este aumento de incidência, Kaufman e Blumer (1977) referiram-se às infecções por *Cryptococcus neoformans* como *the awakening giant*, profetizando o que viria a acontecer com a epidemia do vírus da imunodeficiência humana (VIH). A infecção por este fungo tornou-se preocupante quando começou a afectar 5 a 30% dos doentes atingidos pelo SIDA, com valores mais elevados na África sub-sariana (Mitchell & Perfect 1995). A forma mais frequente de infecção é uma meningoencefalite grave que afecta principalmente indivíduos com acentuada depressão imunitária, podendo a levedura disseminar para outros órgãos ou sistemas. Deste modo, a importância médica de *C. neoformans* veio a aumentar dramaticamente em consequência da epidemia do SIDA. Se antes de 1980 a criptococose era uma infecção pouco frequente, no início da década de 90 já era epidémica em algumas regiões do Globo (Currie & Casadevall 1994, Vandepitte 1990).

Foi também na década de 70 que começaram a surgir estudos com técnicas de biologia molecular em *C. neoformans*. Nos primeiros trabalhos foi determinado o conteúdo em guanina e citosina (%mol GC) do DNA nuclear e foram avaliadas as relações taxonómicas com espécies próximas e entre estirpes de *C. neoformans* através de experiências de reassociação DNA-DNA (Erke & Schneidau 1973). A partir dos finais da década de 80 foram identificados e caracterizados alguns genes, como por exemplo os genes do RNA ribossómico - rRNA (Fan *et al.* 1994, *idem* 1995, Restrepo & Barbour 1989) e os genes envolvidos na produção de cápsula (Chang & Kwon-Chung 1994), síntese de melanina (Williamson 1994), compatibilidade sexual (Moore & Edman 1993) e biossíntese de certas enzimas (Edman & Kwon-Chung 1990, Perfect *et al.* 1993).

As abordagens moleculares foram essenciais para apreciar mais correctamente a posição filogenética de *C. neoformans* entre os basidiomicetas, integrado na ordem das Tremellales e classe Hymenomyces (Fig. 1.2). As sequências da subunidade 5,8S do rDNA e das zonas intergénicas foram o suporte para a confirmação da semelhança de *C. neoformans* com *Tremella mesenterica* (Fan *et al.* 1994). Através desta análise filogenética, o teleomorfo *Filobasidiella neoformans* foi considerado próximo do fungo filamentoso *Filobasidiella depauperata*, sem estado leveduriforme conhecido, e claramente separado do género *Filobasidium* com o qual anteriormente tinha sido sugerida uma grande proximidade. *F. neoformans* produz colónias de cor branca a creme, frequentemente mucosas quando cresce em meio sólido. Não produz filamentos ou hifas septadas, as células leveduriformes produzem cápsula e a reprodução vegetativa faz-se por gemulação. Distingue-se de *Cryptococcus albidus* pela assimilação de nitrato e nitrito, positiva nesta última espécie (Barnett *et al.* 2000).

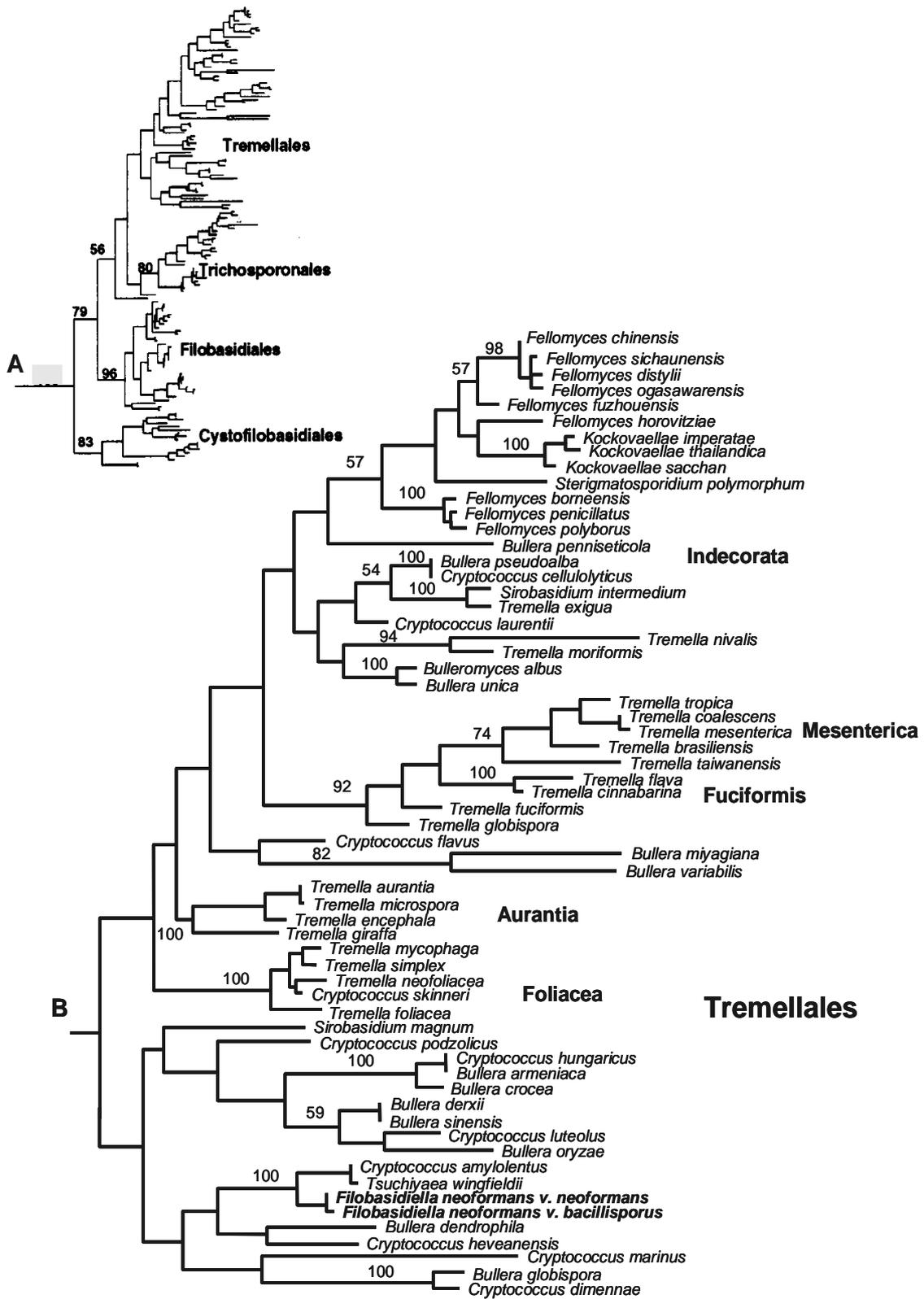


Fig. 1.2 - Topografia das árvores filogenéticas da classe Hymenomycetes (A) e da ordem Tremellales (B) com base nas sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S (adaptado de Fell *et al.* 2001).

A maioria dos isolados clínicos ou ambientais de *C. neoformans* são haplóides e heterotáticos, embora tenham sido descritas raras estirpes autoférteis, produtoras de basidiósporos, sem que tivesse havido cruzamento (Kwon-Chung 1976a, *idem* 1976b). Estes isolados podem ser diplóides ou aneuplóides e podem tornar-se estéreis depois de repicagens sucessivas, de clonagem ou quando mantidos em meio de cultura por longos períodos de tempo (White & Jacobson 1985).

Quando células de estirpes sexualmente compatíveis são cruzadas em meios de cultura pobres em nutrientes e incubadas à temperatura de 30°C (Dong & Courchesne 1998), conjugam-se (Fig. 1.3), produzem hifas dicarióticas e formam septos, poros do tipo doliporo e ansas de anastomose (Kwon-Chung & Popkin 1976).

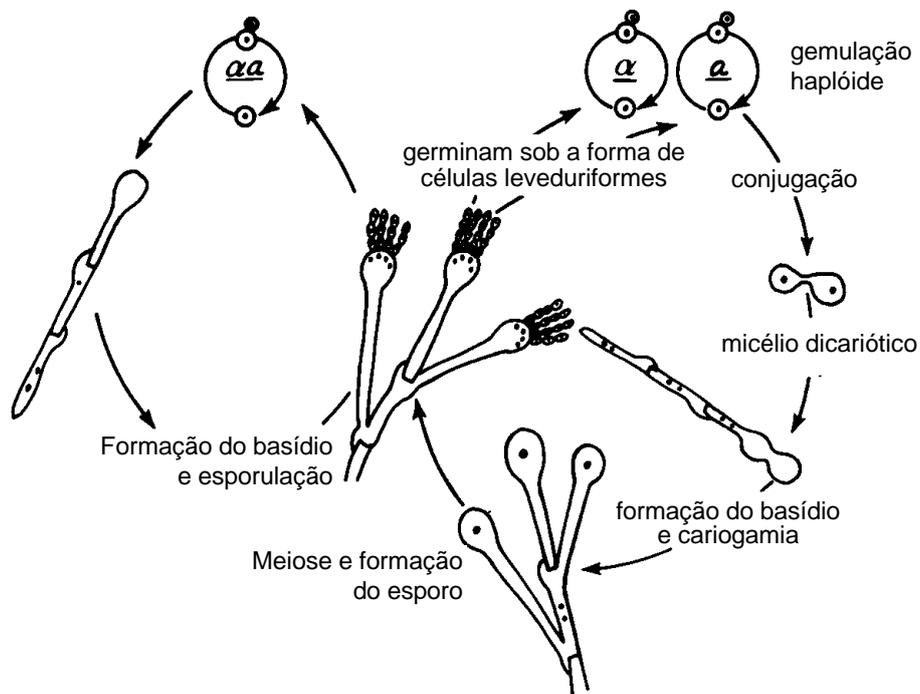


Fig. 1.3 - Ciclo de vida de *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung & Bennett 1992).

Estas hifas produzem basídios terminais, subglobosos a clavados, nos quais ocorre cariogamia e meiose. A meiose ocorre próximo do apex do basídio e os basidiósporos formados têm dimensões médias de 1,8 x 2 μm , podendo atingir os 3 x 5 μm . São uninucleados, esféricos ou ovais, e têm uma parede finamente rugosa (Erke 1976). Os basidiósporos são secos e não têm cápsula mas, quando colocados em meio de cultura, re-

hidratam-se e transformam-se em poucas horas em células leveduriformes com cápsula. O teleomorfo pode ser observado ao fim de uma a três semanas (Ellis & Pfeiffer 1992, Kwon-Chung 1975). Os cruzamentos entre estirpes sexualmente compatíveis do serotipo D produzem o estado *Filobasidiella* mais rapidamente do que os cruzamentos de AxD ou AxA. Nos isolados da var. *gattii* o processo é idêntico, mas os basidiósporos são em forma de bastonete (1 a 1,8 x 3 a 8 µm), com parede lisa.

O aumento da incidência da criptococose permitiu que fossem analisadas centenas de estirpes em estudos de tipagem de DNA, pondo em evidência a diversidade genética dos isolados clínicos e ambientais das duas variedades, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* (Casadevall *et al.* 1992a, Cutler & Erke 1971, Mitchell *et al.* 1994, Varma & Kwon-Chung 1989, Varma *et al.* 1995).

Uma contribuição importante para a compreensão das diferenças ecológicas entre as duas variedades, e a sua relação com a patogênese, surgiu quando Ellis e Pfeiffer apontaram para o nicho ecológico de *C. neoformans* var. *gattii* isolando estirpes do serotipo B a partir de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália e em São Francisco, na Califórnia (Ellis & Pfeiffer 1990b, Pfeiffer & Ellis 1991).

Em estudos de genética clássica foram cruzadas estirpes das duas variedades entre si (Kwon-Chung *et al.* 1982a, Schmeding *et al.* 1981). Foi obtida uma geração F1 em que somente 30% dos esporos germinaram. Contudo, como não foi feita a análise dos basidiósporos nem ficou demonstrado com clareza se tinha havido meiose, ficou por documentar se o cruzamento entre as duas espécies/variedades produzia ou não descendência fértil (Aulakh *et al.* 1981, Boekhout *et al.* 1997, *idem* 2001).

A existência de duas variedades distintas de *C. neoformans* é consistente com os perfis electroforéticos de proteínas e perfis de ácidos gordos totais (Kwon-Chung *et al.* 1992b, Smit *et al.* 1987, Vancanneyt *et al.* 1992). No entanto, estudos mais recentes com base em características bioquímicas e em polimorfismos genéticos (Varma *et al.* 1995, Wickes *et al.* 1994) apontam para diferenças suficientemente significativas que levaram os seus autores a sugerir a separação de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* em duas espécies distintas (Boekhout *et al.* 1997, *idem* 2001, Diaz *et al.* 2000). A análise de um grande número de isolados clínicos e ambientais, que incluiu todos os serotipos de *C. neoformans*, no que respeita a sequências de fragmentos menos conservados do rDNA conduziu à sugestão de que a var. *gattii* venha a constituir uma

espécie distinta para a qual foi proposto o nome de *Cryptococcus bacillisporus* (sinónimo de *C. neoformans* var. *gattii*), cujo teleomorfo seria designado por *Filobasidiella bacillispora*. *Filobasidiella neoformans* ficaria, assim, a corresponder ao estado teleomórfico de *C. neoformans*.

Nestes últimos anos, a análise molecular realizada com o objectivo de diferenciar as variedades de *C. neoformans* permitiu também detectar algumas diferenças genéticas entre os serotipos A e D de *C. neoformans* var. *neoformans* (Franzot *et al.* 1998a). As primeiras diferenças foram detectadas em 1993 por Guého *et al.* quando sequenciaram o domínio variável D1/D2 do gene da subunidade 26S do RNA ribossómico (rDNA 26S) e encontraram três bases de diferença entre os serotipos A e D. Nesse trabalho concluiu-se que as estirpes do serotipo D eram filogeneticamente próximas das dos serotipos B e C e que as do serotipo A se destacavam das dos outros serotipos (Guého *et al.* 1993).

A análise dos polimorfismos resultantes da aplicação de uma sonda baseada num elemento repetitivo do genoma de *C. neoformans* (*CNRE-1*) permitiu observar a existência de heterogeneidade genética entre isolados clínicos desta levedura (Spitzer & Spitzer 1992, Spitzer *et al.* 1993). Da hibridação de *CNRE-1* com o DNA de isolados dos serotipos A e D, seguida de digestão com *SacI*, resultou um conjunto de padrões de restrição (RFLP) que separaram em dois grupos distintos as estirpes do serotipo A das do serotipo D (Franzot *et al.* 1998a). A análise da sequência dos nucleótidos do gene *URA5* de seis isolados de cada um dos dois serotipos A e D indicaram, uma vez mais, a segregação destes serotipos em dois grupos distintos (Franzot *et al.* 1998a). Com base nas diferenças observadas, Franzot *et al.* (1999) propuseram a separação dos isolados dos serotipos A e D em duas variedades distintas da mesma espécie. Como a descrição original de *C. neoformans* var. *neoformans* corresponde a uma estirpe do serotipo D (Kwon-Chung 1975), estes autores propuseram a designação *C. neoformans* var. *grubii* para os isolados do serotipo A.

De realçar que outros autores (Diaz *et al.* 2000, Fell *et al.* 2000) consideram as diferenças genótípicas insuficientes para distinguir as variedades *neoformans* e *grubii*, sendo de opinião que a diferenciação das duas variedades com base no serotipo, como proposto por Franzot *et al.* (1999), é inconsistente. Já há anos atrás Cherniack *et al.* (1995) tinham demonstrado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear que a serotipagem dos isolados dos serotipos A, D e AD não constituía um critério diferencial fiável, na medida em que os serotipos A e D dos isolados clínicos se podiam interconverter no decurso de uma infecção.

Muito recentemente, Boekhout e colaboradores (2001) reconheceram a existência de dois grupos genotípicos distintos em *C. neoformans* var. *neoformans* (não directamente relacionados com os serotipos), assim como a de um terceiro grupo de estirpes que sugeriram tratar-se de híbridos que resultavam da expansão clonal após reprodução (para)sexuada entre estirpes dos dois primeiros grupos. A troca de material genético entre isolados com informação diferente poderia resultar no aparecimento de estirpes mais virulentas e/ou mais resistentes aos antibióticos.

C. neoformans é um fungo cosmopolita e em todas as regiões do Mundo têm sido referidos casos de infecção criptocócica. Este fungo é um organismo de vida livre e pode sobreviver numa grande variedade de ambientes (Swinne-Desgain 1975). Nos últimos 50 anos foram feitos progressos consideráveis no sentido de compreender a ecologia de *C. neoformans* e a sua relação com a epidemiologia das infecções criptocócicas.

As duas variedades mais geralmente reconhecidas de *C. neoformans* diferem na sua distribuição geográfica e habitat: *C. neoformans* var. *neoformans* encontra-se disperso, enquanto *C. neoformans* var. *gattii* parece estar limitado a regiões tropicais. *C. neoformans* var. *neoformans* é frequentemente isolado a partir de excrementos de pássaro e, em particular, de pombo (*Columba livia*). Ocorre ocasionalmente em outros substratos (Tabela 1.1), tais como sumos fermentados e madeira ou na atmosfera (Levitz 1991, Mitchell & Perfect 1995, Swinne-Desgain 1975).

Um grande número de trabalhos refere o isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* a partir de materiais de árvores e plantas. Esta levedura foi, por exemplo, encontrada em pedaços de madeira que se desagregavam de zonas ocas do tronco de árvores vindas do Brasil (Lazera *et al.* 1996). De salientar que *C. neoformans* produz a enzima lacase (Williamson 1994) e a actividade fenoxidásica também está associada à capacidade de degradar a lenhina da madeira (Eggert *et al.* 1996, Lazera *et al.* 1996). Apesar da var. *gattii* estar classicamente associada aos eucaliptos, a var. *neoformans* também foi isolada a partir de eucaliptos (Duarte *et al.* 1994, Martins *et al.* 1996).

É provável que a disseminação de *C. neoformans* var. *neoformans* seja o motivo porque têm sido referidas infecções humanas e animais igualmente em todos os continentes. Apesar disso, tem-se observado que há regiões onde o número de infecções criptocócicas é mais frequente do que noutras. Por exemplo, nos E.U.A. os

casos de criptococose são mais comuns nos Estados do Sudoeste do que nos montanhosos (Kwon-Chung *et al.* 1990). Contudo, esta variedade tem sido isolada tanto em zonas temperadas como em zonas tropicais.

Tabela 1.1 - Tipo de ambiente não-infeccioso e distribuição geográfica de *Cryptococcus neoformans*.

Ambiente	Dist. geográfica	Referências
Água	Europa	Swinne-Desgain 1975
Atmosfera	América do Norte Europa	Bulmer 1990 Swinne-Desgain 1974
Ar condicionado	América do Norte	Botard & Kelley, 1969
Árvores	América do Norte Brasil	Denton & Di Salvo 1968 Lazera <i>et al.</i> 1993, <i>idem</i> 1996
Excrementos de aves	América do Norte Ásia Europa	Gustin & Kelley 1971 Imwidthaya <i>et al.</i> 1989 Bauwens <i>et al.</i> 1986, Criseo & Gallo 1997
Excrementos de pombo	África América do Norte América Central América do Sul Ásia Europa	Refal <i>et al.</i> 1983 Emmons 1955, <i>idem</i> 1960, Littman & Schneierson 1959 Castañón-Olivares & López-Martinez 1994 Ruiz <i>et al.</i> 1989, Silva & Paula 1963 Ansheng <i>et al.</i> 1993 Partridge & Winner 1965, Swinne-Desgain 1974
Frutos/Sumos	Europa	Sanfelice 1894, Staib 1962, Staib <i>et al.</i> 1973
Leite	América do Norte Europa	Pounden <i>et al.</i> 1952 Carter & Young 1950
Ninhos	América do Norte	Denton & DiSalvo 1968, Emmons 1955
Pó doméstico	África América do Norte	Swinne <i>et al.</i> 1986a Denton & DiSalvo 1968
Serradura	Europa	Bauwens <i>et al.</i> 1986
Solo	América do Norte Austrália Europa	Ajello 1956, <i>idem</i> 1958, Emmons 1951 Frey & Durie 1964 Sotgiu <i>et al.</i> 1966

A descoberta da associação de *C. neoformans* var. *gattii* com as árvores de *Eucalyptus camaldulensis* (eucalipto vermelho do rio) por Ellis e Pfeiffer (1990a) foi importante para a compreensão da ecologia desta variedade. O estudo da vegetação do vale Barossa, na Austrália, mostrou uma elevada prevalência de isolados da variedade *gattii* nas amostras provenientes desta espécie de eucalipto. *C. neoformans* var. *gattii* foi igualmente isolado a partir de material proveniente de árvores de *E. camaldulensis* em S. Francisco, nos E.U.A. (Pfeiffer & Ellis 1991) e na cidade do México (Licea *et al.* 1996). A

mesma variedade tem sido ainda isolada no Brasil (Lazera *et al.* 1993) e Uruguai (Gezuele *et al.* 1993) também associada a outra espécie de eucalipto, *E. tereticornis* (eucalipto vermelho da floresta), uma espécie muito próxima de *E. camaldulensis* (Pfeiffer & Ellis 1992).

O estudo de eucaliptos em África (Batchelor *et al.* 1994) e na América do Sul (Duarte *et al.* 1994) não originou isolados de *C. neoformans* var. *gattii*, apesar de estarem documentados casos de infecções em humanos destas áreas por esta variedade. Currie *et al.* (1990) referiram uma elevada incidência de infecções por *C. neoformans* var. *gattii* em Port Moresby, na Nova Guiné, apesar da ausência de *E. camaldulensis* nessa região. Também uma estirpe identificada molecularmente como pertencente à variedade *gattii* e proveniente da Austrália Ocidental, onde não existe nenhuma das duas espécies de eucaliptos (Sorrell *et al.* 1996a, *idem* 1996b), sugerem a existência de outros habitats naturais para *C. neoformans* var. *gattii*. Recentemente, foi isolado um número elevado de estirpes da variedade *gattii* a partir de outras três espécies de eucaliptos, *E. rudis*, *E. gomphocephala* e *E. blakelyi* (Halliday *et al.* 1999, www.mycology.adelaide.edu.au).

1.2. FACTORES DE VIRULÊNCIA

Em geral, a análise dos factores de virulência de um determinado microrganismo envolve a infecção experimental e a comparação de taxas de mortalidade, histopatologia ou viabilidade celular em órgãos específicos. Em particular, os fungos, para conseguirem sobreviver no interior de um hospedeiro, desenvolveram mecanismos que lhes permitem multiplicar nessas condições tão particulares e adversas, causando doença (Kurokawa *et al.* 1998, Mitchell & Perfect 1995). Os vários factores que contribuem para o estabelecimento de uma infecção são designados por factores de virulência.

Para que um organismo cause doença deve: (i) entrar no hospedeiro; (ii) multiplicar-se nos tecidos; (iii) resistir aos (ou não estimular os) mecanismos de defesa do hospedeiro, e (iv) causar prejuízo ao hospedeiro.

A virulência de um determinado fungo não pode ser atribuída a um único factor, mas antes a um conjunto de factores que, actuando em conjunto, causa uma infecção progressiva. A gravidade da infecção causada por *C. neoformans* em cada indivíduo resulta

da combinação dos vários factores de virulência, da quantidade de inóculo e do estado de susceptibilidade imunitária do próprio hospedeiro.

C. neoformans é considerado agente patogénico na medida em que é capaz de causar infecção num hospedeiro. Como os indivíduos imunodeprimidos são mais susceptíveis à infecção por esta levedura do que os indivíduos imunocompetentes, esta espécie é considerada patogénica oportunista.

Os mecanismos de virulência mais importantes em *C. neoformans* não estão bem esclarecidos. Vários factores têm sido identificados como essenciais, mas não suficientes para o estabelecimento da infecção: produção da cápsula polissacarídea (Chang & Kwon-Chung 1994), síntese de melanina (Rhodes *et al.* 1982), produção de proteases extracelulares (Brueske 1986), capacidade de resistir à temperatura de 37°C (Rhodes *et al.* 1982) e *mating-type* (Kwon-Chung *et al.* 1992a).

1.2.1. A Cápsula Polissacarídea

A cápsula de *C. neoformans* é formada essencialmente por polímeros lineares de α -1,3-manano com ramificações, em proporções variáveis, de xilose e ácido glucurónico (Casadevall *et al.* 1992b). É provável que no estado saprofítico, na Natureza, a cápsula proteja a célula de *C. neoformans* da desidratação e reduza a possibilidade das células serem destruídas por amibas do solo ou outros agentes agressivos (Neilson *et al.* 1978). Com base nas proporções entre resíduos de xilose e ácido glucurónico, no grau de ramificações na cadeia de manano e na percentagem de ligações O-acetil, *C. neoformans* pode ser separado em quatro grupos antigénicos (A, B, C e D).

A cápsula é considerada como o factor de virulência mais importante em *C. neoformans*, tendo sido demonstrado o seu efeito em diferentes aspectos relacionados com a imunidade do hospedeiro. Observou-se, por exemplo, que a presença da cápsula conduz a um aumento da carga negativa das células (Nosanchuck & Casadevall 1997), propriedades antifagocíticas (Kozel *et al.* 1988), inibição da migração de leucócitos e inactivação de anticorpos (Dong & Murphy 1995, Kozel *et al.* 1977), e estimulação da formação de edema cerebral (Hirano *et al.* 1965a, *idem* 1965b). A actividade antifagocítica da cápsula persiste nos fluidos corporais e evita que a levedura seja detectada pelo sistema imunitário. Experiências *in vitro* mostraram que células leveduriformes sem cápsula são

mais facilmente fagocitadas do que células de estirpes capsuladas ou de estirpes acapsuladas às quais foi adicionado polissacárido (Small & Mitchell 1989).

A dimensão da cápsula varia com a estirpe, tal como a virulência, mas não parece haver uma correlação entre estas duas variáveis (Dykstra *et al.* 1977). Para a mesma estirpe, a dimensão da cápsula depende ainda das condições de cultura (Fries *et al.* 1999). Em criptococoses induzidas em modelos animais, mutantes acapsulados de *C. neoformans* revelaram ser menos virulentos do que as estirpes selvagens capsuladas (Fromtling *et al.* 1982a). São raros os casos de criptococose humana causados por isolados acapsulados ou com cápsulas reduzidas (Bottonne *et al.* 1986, Farmer & Komorowski 1973).

Chang e Kwon-Chung (1994) identificaram e isolaram um gene que suprimia a mutação de uma estirpe acapsulada e restabelecia a sua virulência. Posteriormente, através da análise de recombinantes genéticos (Still & Jacobson 1983), vários genes envolvidos na síntese da cápsula foram sendo gradualmente identificados e caracterizados (Chang & Kwon-Chung 1998, *idem* 1999, Chang *et al.* 1996, *idem* 1997).

1.2.2. Produção de Pigmento

C. neoformans produz oxidases de compostos fenólicos que convertem uma variedade grande de substratos hidroxibenzóicos, incluindo catecolaminas, em pigmentos castanho-escuros do tipo melanina (Polacheck *et al.* 1982, Wang *et al.* 1995). Estes pigmentos podem ajudar a proteger as células da levedura dos efeitos oxidantes antimicrobianos nos tecidos do hospedeiro (Jacobson & Emery 1991b, Jacobson *et al.* 1994, Jacobson & Tinnell 1993; Wang & Casadevall 1994c, Wang *et al.* 1995). A produção de melanina por esta levedura dá-se na presença de oxigénio molecular, sob condições limitantes de glucose. O di-hidroxifenol é oxidado para a quinona correspondente, a qual se rearranja espontaneamente através de uma polimerização sequencial que, após nova oxidação, conduz à formação de melanocromo e de melanina (Torres-Guerrero & Edman 1994). No tecido cerebral há quantidades significativas de dopa, norepinefrina, epinefrina e dopamina que podem servir de substrato à lacase de *C. neoformans*. A relativa inespecificidade da enzima pode resultar num conjunto variado de compostos que, *in vivo*, podem interagir entre si aumentando o correspondente espectro de acção (Ikeda *et al.* 1993, Williamson 1994).

A melanização em *C. neoformans* tem sido associada à virulência das estirpes através da observação de um conjunto muito variado de fenómenos: interfere com as respostas imunitárias (Huffnagle *et al.* 1995), aumenta a resistência à amfotericina B (Wang & Casadevall 1994b) e protege as células dos agentes oxidantes (Jacobson & Tinnell 1993, Wang & Casadevall 1994c) e da radiação ultravioleta (Wang & Casadevall 1994a). Contudo, o papel específico da melanina na patogénese da infecção ainda não é claro (Casadevall *et al.* 2000).

A capacidade que *C. neoformans* tem para transformar catecolaminas, que funcionam como neurotransmissores no sistema nervoso central do hospedeiro, em melanina poderá contribuir para explicar o forte neurotropismo deste fungo patogénico (Polacheck *et al.* 1982, Polacheck & Kwon-Chung 1988). Consistente com esta hipótese, verificou-se que as áreas do cérebro ricas em catecolaminas (como os gânglios basais) são frequentemente invadidas por *C. neoformans* nos casos de meningoencefalite criptocócica. Já foram observadas no cérebro células de *C. neoformans* pigmentadas e é provável que esse pigmento seja melanina (Kwon-Chung *et al.* 1981, Lee *et al.* 1996).

É igualmente comum a observação de células melanizadas de *C. neoformans* em excrementos de pombo (Nosanchuk *et al.* 1999). Estudos *in vitro* mostraram que essas células melanizadas são menos susceptíveis aos efeitos fungicidas da luz UV, o que poderá indicar um papel protector do pigmento contra a exposição à luz solar.

1.2.3. Actividades Enzimáticas

Nas células de *C. neoformans* e nos sobrenadantes das culturas tem sido detectada não só uma grande actividade proteolítica como a de outras enzimas associadas ao grau de agressividade das estirpes estudadas. É provável que estas enzimas actuem na destruição dos tecidos do hospedeiro e/ou interfiram com os seus mecanismos de defesa, contribuindo para a disseminação e aumento da virulência do fungo.

C. neoformans produz DNAses extracelulares que degradam o DNA do hospedeiro a fim de obter nucleótidos. Em estudos moleculares da levedura estas enzimas impedem, frequentemente, a obtenção de moléculas de DNA de peso molecular elevado (Cazin *et al.* 1969). É possível, no entanto, inibir a acção das DNAses utilizando concentrações elevadas

de EDTA nas extracções de DNA (Casadevall *et al.* 1992a, Spitzer & Spitzer 1992, Varma & Kwon-Chung 1991).

Foi referida por Hamilton e Holdom (1997) a presença de duas superóxido-dismutases (SOD) em *C. neoformans*. É sabido que estas enzimas protegem as células dos danos causados por radicais superóxido (O_2^-), transformando-os em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio (O_2). Jacobson *et al.* (1994) verificaram que a síntese das superóxido-dismutases é regulada pela temperatura, sendo estimulada a 37°C em comparação com 25°C. Este aumento à temperatura do corpo humano poderá proteger o fungo do stress oxidativo com origem no sistema imunitário do hospedeiro.

As fosfolipases têm sido igualmente associadas à virulência de *C. neoformans* e é provável que a sua função seja a de destruir os lípidos membranares das células do hospedeiro, promovendo a adesão aos tecidos (Chen *et al.* 1997b, *idem* 1997c, Cox *et al.* 2001, Ghannoum 2000).

Nas culturas de *C. neoformans* tem sido igualmente identificada a presença de actividade proteolítica extracelular e foi sugerido que esta actividade é produzida por vários tipos de proteases (Aoki *et al.* 1994, Brueske 1986, Chen *et al.* 1996a, Federici 1982). A síntese de proteases pode contribuir para um aumento da virulência, destruindo proteínas do hospedeiro importantes sob o ponto de vista imunológico, facilitando a invasão dos tecidos e interferindo com os seus mecanismos de defesa (Müller & Sethi 1972). O exame histopatológico em infecções murinas experimentais por *C. neoformans* revelou necrose tecidular e degradação da matriz extracelular (Salkowski & Balish 1991). Apesar da actividade proteolítica em culturas laboratoriais de *C. neoformans* só ser detectável ao fim de uma semana (Chen *et al.* 1996a), esta actividade parece ser suficiente para permitir o crescimento do organismo em meios contendo unicamente imunoglobulina ou proteínas do sistema imunitário humano como únicas fontes de carbono e de azoto (Chen *et al.* 1997a).

1.2.4. Termotolerância

De um modo geral, as estirpes de *C. neoformans* são capazes de crescer bem à temperatura do corpo dos mamíferos - 37°C (Kwon-Chung 1998, Swinne 1979b), podendo suportar temperaturas superiores até um máximo de 39-40°C (Kligman & Weidman 1949, Van Uden *et al.* 1958). Este fenótipo é um requisito muito importante na sobrevivência do

fungo como parasita (Rhodes *et al.* 1982). Um mutante termosensível revelou-se avirulento em modelo murino (Kwon-Chung *et al.* 1992c). Mais recentemente, um estudo molecular identificou uma via metabólica em que a calcineurina se mostra essencial para o crescimento de *C. neoformans* à temperatura de 37°C (Odom *et al.* 1997). É possível também que a existência da cápsula contribua para aumentar a capacidade de resistência desta levedura a 37°C ou a temperaturas superiores, pois sabe-se que a sua temperatura ótima de crescimento ronda os 32°C (Kwon-Chung 1998).

1.2.5. *Mating-Type*

Tanto a partir de amostras ambientais como clínicas, *C. neoformans* é predominantemente isolado na forma de levedura vegetativa haplóide. A espécie teleomórfica *F. neoformans* tem dois *mating-type* definidos, *Mata* e *Mat α* . Curiosamente, tanto na Natureza como nos isolados clínicos as estirpes *Mat α* são muito mais abundantes do que as estirpes *Mata* (Kwon-Chung & Bennett 1978). Quando estirpes congénicas do serotipo D que diferem só no *mating-type* são usadas para infectar modelos murinos, as estirpes *Mat α* são significativamente mais virulentas do que as estirpes *Mata* (Kwon-Chung *et al.* 1992a). Contudo, o mecanismo responsável por esta diferença de virulência baseada no *mating-type* está, neste momento, ainda por explicar (Halliday *et al.* 1999).

Wickes *et al.* (1996) verificaram que em condições de stress de azoto as estirpes *Mat α* iniciavam um processo de diferenciação e produção de hifas, designado por frutificação haplóide ou auto-esporulação. Observaram ao microscópio esses filamentos haplóides e viram ansas de anastomose e basidiósporos. Posteriormente, verificaram que esses esporos também eram haplóides e *Mat α* . Com as estirpes *Mata* nunca foi descrito um fenómeno semelhante. Estas somente produzem filamentos e esporos quando se cruzam com estirpes *Mat α* . A observação de Wickes pode contribuir para esclarecer a associação do locus *Mat α* com a virulência e a ocorrência de um número mais elevado de infecções por estirpes deste tipo. Aliás, os basidiósporos são mais indicados para funcionar como propágulos infecciosos na atmosfera, por serem mais pequenos (2 μ m) e mais resistentes à desidratação do que as células leveduriformes. Foi também observado que as células *Mat α* parecem produzir mais melanina do que as células congénicas *Mata* (Wickes *et al.* 1996). Foi ainda identificada uma região de ~55 kb do locus *Mat α* que codifica uma feromona que está envolvida na compatibilidade sexual e na virulência (Moore & Edman 1993). É hoje

possível, através de técnicas moleculares, identificar rapidamente os *mating-types* de *C. neoformans*, o que pode ser útil na caracterização epidemiológica de isolados clínicos (Chatuverdi *et al.* 2000, Lengeler *et al.* 2000). O conhecimento da possibilidade dos microrganismos patogênicos se recombinarem sexualmente é muito importante, pois contribuiu para explicar a sua capacidade de sobrevivência em relação às respostas imunitárias dos hospedeiros e de adaptação a alterações do meio ambiente, nomeadamente as causadas pela terapêutica antifúngica.

1.3. EPIDEMIOLOGIA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

1.3.1. Ocorrência e Incidência da Infecção

A natureza esporádica da criptococose humana, a sua não contagiosidade (Beyt & Waltman 1978), o isolamento de estirpes não virulentas a partir da pele, mucosas e fezes com frequência insuficiente para se considerar uma fonte de infecção endógena, assim como a elevada prevalência de *C. neoformans* no ambiente, foram as razões para, na década de 50, Emmons sugerir que a exposição do homem e dos animais às partículas infecciosas ambientais explicava a epidemiologia da criptococose (Emmons 1955).

É geralmente aceite que *C. neoformans* entra no hospedeiro através do tracto respiratório, sob a forma de levedura haplóide desidratada ou de basidiósporos (Levitz 1991). Após algum tempo nos pulmões, o fungo migra por disseminação hematogénea em direcção aos tecidos extra-pulmonares. Como tem um tropismo pelo sistema nervoso central, os indivíduos infectados geralmente contraem meningoencefalite. A meningite, e menos frequentemente a pneumonia, são as manifestações clínicas mais comuns, embora a infecção possa eventualmente atingir outros órgãos ou sistemas, nomeadamente a pele. Quando não tratada, a meningite é fatal em 100% dos casos e, muitas vezes, apesar de ser tratada com fármacos antifúngicos eficazes, as infecções por *Cryptococcus* podem ser fatais se o hospedeiro não tiver uma adequada função imunitária dependente das células-T (Müller 1990). Os hospedeiros imunocompetentes parecem induzir uma forte resposta imunitária com uma intensa reacção inflamatória e uma infecção muito menos grave (Farmer & Komorowski 1973).

Para que uma partícula entre nos espaços alveolares dos pulmões é necessário ter um diâmetro inferior a 4 μm . As células leveduriformes de *C. neoformans* encontradas no solo e nos ninhos das aves possuem uma cápsula mínima e podem ter dimensões próximas de 2,5 μm sendo facilmente aerosolizadas. Por outro lado, os basidiósporos de *F. neoformans*, que se provou serem patogênicos para animais experimentais, têm características mais adequadas para a deposição nos alvéolos pulmonares: são de menor dimensão (1,8 a 3 μm), são mais facilmente aerosolizados e são muito mais resistentes à desidratação do que as células leveduriformes. Uma vez nos pulmões, as partículas re-hidratam-se e adquirem a cápsula polissacarídea característica (Kwon-Chung & Bennett 1992, Neilson *et al.* 1977, Wickes *et al.* 1996).

Foi primeiro sugerido que *C. neoformans* se incluía entre os organismos comuns da pele humana, das membranas mucosas e do tracto gastrointestinal (Benham 1934, *idem* 1935, Emmons *et al.* 1977), mas avanços nos métodos de classificação de leveduras permitiram concluir que muitos desses isolados não representavam *C. neoformans*. Provou-se, então, que este fungo raramente é isolado de indivíduos saudáveis e que a probabilidade do seu isolamento a partir de amostras humanas é mais elevada em indivíduos doentes (Howard 1973, McGinnis *et al.* 1975, Randhawa & Paliwal 1977). Em 27 doentes com doença neoplásica, Reiss e Szilagyi (1965) isolaram a levedura em seis casos, a partir de amostras da orofaringe. Randhawa e Pal (1977) isolaram o agente em 3% de 649 doentes com doença broncopulmonar. Mais recentemente, 20% dos casos diagnosticados por Arsic (2000), na Sérvia, correspondiam a doentes com linfoma de Hodgkins, 8% a transplantados renais e 8% a doentes sujeitos a terapêutica com corticóides.

Antes da epidemia do SIDA, cerca de 50% dos casos de criptococose ocorriam em doentes sem nenhuma evidência de imunodepressão ou estavam associados a diversas perturbações nosológicas. Desde a década de 80, a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) tornou-se no principal factor predisponente da criptococose (Chuck & Sande 1989, Dismukes 1988, Kovacs *et al.* 1985).

A partir de um estudo feito na região de Atlanta (E.U.A.) entre 1998 e 2000 que incluiu centenas de casos de criptococoses tanto em doentes imunocompetentes como em imunocomprometidos, observou-se que a ocorrência da criptococose nos doentes com SIDA decresceu consideravelmente, mantendo-se constante a incidência desta infecção em doentes imunocompetentes. A mortalidade da infecção nos doentes com SIDA manteve-se,

no entanto, nos 10%, como anteriormente (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, U.S.A., 2000).

Para além do estado imunitário dos doentes, há actividades humanas que podem aumentar o risco de infecção por *C. neoformans*, nomeadamente as relacionadas com a permanência em pombais e a manipulação de pombos (Pal 1993). Relativamente à ocorrência nos dois sexos, as criptococoses são três vezes mais frequentes nos homens do que nas mulheres (Mohr *et al.* 1972, Sekhon *et al.* 1990). Há, igualmente, inúmeras referências de infecções criptococócicas em animais (Connolly *et al.* 1999, Emmons 1952, Faggi *et al.* 1993, Malik *et al.* 1995, Pal 1991).

1.3.2. As Variedades de *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans var. *neoformans* é o agente etiológico da maior parte das infecções criptococócicas no ser humano e da quase totalidade das infecções em doentes infectados pelo VIH, embora ambas as variedades de *C. neoformans* causem infecções com quadros clínicos muito semelhantes.

A variedade *gattii* raramente é causa de infecção disseminada em doentes com SIDA, mesmo nas áreas endémicas (Abraham *et al.* 1997, Bottone *et al.* 1986, Castañon-Olivares *et al.* 1997, Laurensen *et al.* 1993, Rozenbaum *et al.* 1990, *idem* 1992, Speed & Dunt 1995, Speed *et al.* 1993), e desconhece-se ainda a causa da raridade desse tipo de infecções. Foram estudadas por um grupo australiano as diferenças das manifestações clínicas e as consequências das infecções com ambas as variedades e verificou-se que a mortalidade era mais elevada nas infecções causadas pela variedade *neoformans* (Fisher *et al.* 1993). Contudo, as infecções causadas pela variedade *gattii*, apesar de resultarem numa taxa de mortalidade mais baixa, traziam mais complicações por sequelas neurológicas que muitas vezes requeriam cirurgia e uma terapêutica mais prolongada (Speed & Dunt 1995).

Uma vez que *C. neoformans* var. *neoformans* ocorre com maior frequência em doentes com SIDA (Bottone *et al.* 1987, Rinaldi *et al.* 1986, Shimizu *et al.* 1986, Speed *et al.* 1993), é natural que a elevada percentagem de casos de SIDA incluídos no número de isolados indicados na Tabela 1.2 contribua para a predominância da var. *neoformans* na literatura mais recente. No Zaire, a maioria dos isolados antes de 1970 eram de *C. neoformans* var. *gattii*, mas depois desse ano unicamente foram encontradas estirpes da

var. *neoformans* em amostras clínicas devido ao facto de ter aumentado significativamente o número de casos de criptococose associada a SIDA (Swinne 1984, Swinne *et al.* 1986b). Situações semelhantes foram observadas no Brasil e na Califórnia antes e depois de 1980 (Tabela 1.3). No entanto, uma melhor capacidade para distinguir as duas variedades também contribuiu para justificar as diferenças de ocorrência relativa encontradas.

Tem sido referido um número reduzido de infecções por *C. neoformans* var. *gattii* nas regiões temperadas (Bottone *et al.* 1986, Dromer *et al.* 1992, *idem* 1996a, Fromtling *et al.* 1982b, Kohl *et al.* 1985, Lehmann *et al.* 1984, St.-Germain *et al.* 1988). Desconhece-se a fonte de infecção e o percurso do agente nos casos esporádicos de criptococose originada pela var. *gattii* nestas regiões, mas é provável que alguns casos correspondam a uma activação de infecções latentes adquiridas em áreas tropicais ou subtropicais. Todavia, são mencionados casos em que esses antecedentes de risco estão completamente excluídos. Muchmore *et al.* (1980) analisaram 80 estirpes isoladas de doentes de Oklahoma (E.U.A.) 12 das quais identificadas como sendo da variedade *gattii*, serotipos B e C. Metade desses doentes viviam há muitos anos naquela região e nunca tinham viajado até zonas onde a var. *gattii* é prevalente. Posteriormente, estes investigadores vieram a isolar *C. neoformans* var. *gattii* de amostras de solo de Oklahoma. Dromer *et al.* (1996a) descreveram dois casos de infecção pela var. *gattii* em indivíduos que nunca tinham saído de França. Desconhece-se a fonte de infecção, mas os autores sugeriram que esta pudesse estar relacionada com a exposição a produtos exóticos importados.

Tabela 1.2 - Ocorrência geográfica, em percentagem, das duas variedades de *Cryptococcus neoformans*.

País	N.º isolados	var. <i>neoformans</i>	var. <i>gattii</i>	Referências
Alemanha	21	100	0	Mishra <i>et al.</i> 1981
Austrália	102	50	50	Ellis 1987
Brasil	83	90	10	Rozenbaum & Gonçalves 1991
Canadá	78	92	8	Kwon-Chung & Bennett 1984a
Caraíbas	6	100	0	Dromer <i>et al.</i> 1993
China	60	97	3	Ansheng <i>et al.</i> 1993
EUA (pré-SIDA)	272	86	14	Bennett <i>et al.</i> 1977
EUA (SIDA)	69	87	13	Kwon-Chung <i>et al.</i> 1990
França	273	100	0	Dromer <i>et al.</i> 1994
Índia	18	83	17	Padhye <i>et al.</i> 1993
Itália	102	100	0	Sagone <i>et al.</i> 1993
México	38	82	18	Cervantes <i>et al.</i> 1993
Nova Guiné	31	19	81	Laurenson <i>et al.</i> 1993
Quênia	20	100	0	Batchelor <i>et al.</i> 1994
Tailândia	30	97	3	Imwidthaya 1994, Imwidthaya <i>et al.</i> 1989
Zaire	40	100	0	Kwon-Chung <i>et al.</i> 1990

Tabela 1.3 - Prevalência das variedades *neoformans* e *gattii* de *Cryptococcus neoformans* em doentes não-SIDA e SIDA nas mesmas áreas geográficas (adaptado de Kwon-Chung *et al.* 1990).

País	Data isolamento	Total	var. <i>neoformans</i>		var. <i>gattii</i>	
			não-SIDA	SIDA	não-SIDA	SIDA
Brasil	< 1980	31	20	0	11	0
	≥ 1980	30	3	25	2	0
Califórnia	< 1980	73	43	0	30	0
	≥ 1980	69	11	49	8	1

1.3.3. Manifestações Clínicas da Criptococose

A infecção criptococócica manifesta-se, em geral, sob a forma de meningoencefalite (Hinrichsen *et al.* 1991), podendo surgir, no entanto, localizações periféricas que eventualmente sugiram uma meningite assintomática e aconselhem uma punção lombar.

O prognóstico de uma criptococose está directamente ligado ao grau de envolvimento do sistema nervoso. A sintomatologia é variável. Em certos casos pode começar por cefaleias bilaterais vagas, frequentemente associadas a febre (Vandepitte 1990). Após algumas semanas de evolução, surgem gradualmente náuseas, vertigens, irritabilidade e confusão mental (Dismukes 1988). Na ausência de diagnóstico, os sintomas agravam-se e podem desencadear alterações da visão, audição, crises convulsivas ou coma (Denning *et al.* 1991).

A pneumopatia por *C. neoformans* raramente surge em primeiro plano (Cameron *et al.* 1991). Na maioria dos casos, a sintomatologia presente não é muito específica: tosse com ou sem expectoração, dor torácica vaga e febre moderada ou ausente (Rozenbaum & Gonçalves 1991). Muitas vezes o diagnóstico é feito após a evolução para uma meningite criptococócica.

Numa pequena percentagem de casos pode ocorrer disseminação hematogénea do agente para outras localizações, nomeadamente para a pele (Bettoli *et al.* 1993, Murakawa *et al.* 1996, Oliveira *et al.* 1992, Soler *et al.* 1995), ossos (Gurevitz *et al.* 1994) e localizações oculares (Schepelmann *et al.* 1993), renais, supra-renais, prostáticas, ganglionares, pancreáticas, hepáticas, etc. (Srur *et al.* 1995).

A criptococose é uma infecção que ocorre nos doentes imunodeprimidos – número de CD4 inferior a 200/mm³ (Kwon-Chung & Bennett 1992, Müller 1990, Pinner & Hajjeh 1995). Faz parte das infecções oportunistas que permitem afirmar o estadió de SIDA nos doentes seropositivos (Robert *et al.* 1986). A meningite surge em cerca de 80% das infecções mas a sintomatologia é muitas vezes discreta (Vandepitte 1990). Como já foi referido, em doentes com SIDA *C. neoformans* pode ocorrer em localizações viscerais múltiplas (Kromminga *et al.* 1990) e mais raramente em lesões cutâneas (Laroche *et al.* 1990, Sato *et al.* 1990). O prognóstico é muito grave e a sobrevivida média é de 6 a 9 meses. O risco de recidiva é particularmente elevado, próximo dos 50% em caso de paragem dos antifúngicos, justificando um tratamento para o resto da vida (Chuck & Sande 1989). Os títulos antigénicos são com frequência muito elevados e torna-se difícil a sua interpretação ao longo do tempo.

1.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico tradicional da criptococose nos laboratórios de microbiologia clínica ainda assenta, actualmente, na pesquisa directa do agente nos produtos biológicos (Arsic 2000) e na pesquisa do antígeno circulante (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, U.S.A., 2000). A pesquisa directa do agente inclui a observação de células leveduriformes no exame microscópico dos produtos infectados e o isolamento da levedura após cultura.

1.4.1. Exame Directo

Em situações de urgência, a observação directa de células encapsuladas da levedura na amostra constitui um auxiliar precioso do diagnóstico. O exame microscópico de uma gota de sedimento após centrifugação do líquido biológico, contrastada com Tinta da China (diluída de 1:3), permite observar as células leveduriformes rodeadas pelo halo claro da cápsula polissacarídea. É indispensável observar cuidadosamente todos os campos da preparação antes de concluir sobre a negatividade do resultado, pois é frequente haver um número reduzido do tipo de células procuradas. Por vezes a cápsula é tão pequena que é de difícil observação, podendo confundir-se *C. neoformans* com outras leveduras que, excepcionalmente, podem ser responsáveis por meningites (*Candida*, *Histoplasma*). É ainda possível observar-se, mais raramente, pseudomicélio rudimentar.

O exame com Tinta da China pode ser feito com todos os líquidos biológicos (líquido cefalorraquidiano - LCR, urina, lavado bronco-alveolar, expectoração) e também com macerados de biópsias. Nas amostras de pus, de expectoração ou de tecido é sempre conveniente fazer a digestão da amostra com hidróxido de potássio a 20% (p/v), a fim de remover artefactos e clarificar a preparação.

Por vezes, observa-se a presença do que aparentam ser células encapsuladas no exame directo muito tempo depois das culturas serem sistematicamente negativas, sendo provável que se tratem de debris celulares. Deste modo, um exame directo positivo não deverá, por si só, ser utilizado para modificar o tratamento na ausência de agravamento do estado clínico do doente.

1.4.2. Detecção do Antígeno Criptocócico

A detecção do antígeno criptocócico é, em geral, feita por aglutinação de partículas de latex sensibilizadas com anticorpos específicos. Há muitos testes comercializados: Pastorex Crypto Plus[®] - Diagnostics Pasteur; Crypto-LA Test[®] - Fumouze; CALAS[®] - Meridian (Grade *et al.* 1991, Liaw *et al.* 1995, Swinne *et al.* 1992). Todos estes testes têm uma excelente sensibilidade e especificidade, embora nem todos os testes incluam controlos negativos e alguns não utilizem a enzima proteolítica pronase que permite melhorar a sensibilidade e a especificidade até cerca de 95%.

Os testes que utilizam a técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) têm a vantagem de permitir analisar mais rapidamente um número elevado de amostras, mas perdem sensibilidade quando os títulos dos antígenos são elevados. Deste modo, tem-se revelado mais útil avaliar a progressão da infecção vs sucesso terapêutico com testes de aglutinação. Há toda a conveniência que seja utilizado sempre o mesmo teste no acompanhamento de um doente, pois podem verificar-se variações antigénicas significativas com uma mesma amostra utilizando testes diferentes.

Existem variadas causas que poderão originar resultados falsos positivos (Blevins *et al.* 1995, Engler & Shea 1994, Whittier *et al.* 1994). Podem estar relacionadas com a presença de factor reumatóide, contaminação da pipeta, desinfectantes ou detergentes utilizados na limpeza das lâminas de vidro ou devidas a infecções causadas por outros fungos com reactividade cruzada - *Trichosporon beigelli* e, potencialmente, outras espécies

de *Cryptococcus* (Blevins *et al.* 1995). Os falsos negativos estão relacionados com a não utilização da enzima pronase (Hoffmann *et al.* 1991) ou com os fenómenos raros de prozona que necessitam de uma diluição da amostra para objectivar a positividade e para os quais a pronase é ineficaz (Hamilton *et al.* 1991, Stockman & Roberts 1983). Deste modo, nos casos em que há suspeita de criptococose é fundamental fazer várias diluições de todas as amostras negativas.

Sob o ponto de vista terapêutico, Powderly *et al.* (1994) consideram que a importância de uma modificação dos títulos antigénicos durante o curso de uma infecção é muito discutível. Para estes autores, as modificações observadas no soro dos doentes com SIDA não se correlacionam com a evolução da infecção. Na nossa experiência pessoal, quando surge a infecção, os títulos no LCR são desde o início elevados, enquanto os títulos no soro só atingem o valor máximo mais tarde, mantendo-se elevados mesmo após uma terapêutica com sucesso. Mesmo depois da cura clínica, é habitual observar-se um título cicatricial no soro, o qual é mais ou menos elevado em função, provavelmente, do estado imunitário do doente. A não diminuição dos títulos no LCR ou o seu aumento durante um tratamento em fase aguda estão quase sempre relacionados com a ineficácia da terapêutica. Do mesmo modo, o aumento do título durante uma terapêutica de manutenção é um forte indicador de recidiva. Apesar das limitações da técnica, a pesquisa sistemática do antigénio criptococócico tem-se revelado útil no diagnóstico precoce de criptococose nos doentes com SIDA. Nestes doentes, o antigénio criptococócico pode ser detectado em praticamente 100% dos casos. Contudo, nos doentes não-SIDA a detecção do antigénio só é positiva em cerca de 60% dos casos de infecção criptococócica confirmada por outros métodos (Ellis 1994).

1.4.3. Isolamento em Cultura e Identificação

O diagnóstico tradicional de *C. neoformans* assenta essencialmente na cultura da levedura em laboratório e na sua identificação subsequente. A cultura é de fácil obtenção em todos os meios habitualmente utilizados para fungos nos laboratórios de microbiologia clínica, excepto na presença de ciclo-heximida. A maioria dos isolados são inibidos por concentrações deste antibiótico acima dos 25 µg/ml. Para o isolamento de *C. neoformans* a partir de produtos biológicos habitualmente contaminados (p.e. expectoração, urina) é conveniente a adição de compostos antibacterianos (cloramfenicol e/ou gentamicina) ao meio de cultura para impedir o crescimento de bactérias. Relativamente ao tipo de produto biológico passível de ser analisado por este meio, a fim de se obter o isolamento do fungo,

somente o sangue constitui exceção, como aliás acontece para as outras micoses profundas. É de realçar que as hemoculturas positivas correspondem a um mau prognóstico e estão associadas a uma mortalidade muito elevada (Hopfer 1995).

A levedura tem capacidade de se multiplicar a 25 e a 37°C e as colónias tornam-se visíveis ao fim de 48 a 72 horas de incubação em meio de agar de Sabouraud. Nas primoculturas, o período pode ser mais longo, 12 a 14 dias ou mesmo até três semanas (Ajello *et al.* 1967). A sementeira do sedimento obtido após centrifugação de um volume significativo de LCR (3-5 ml) aumenta a probabilidade de obtenção de culturas positivas. No caso de *C. neoformans* var. *gattii* as culturas são habitualmente de crescimento mais lento pois requerem cerca de 5 a 7 dias à temperatura de 25-30°C para as colónias se tornarem visíveis. À temperatura da 37°C esta variedade cresce com dificuldade. A identificação da estirpe pura é feita com base em testes de assimilação de diferentes compostos e no teste da urease. Para este efeito são habitualmente usados *kits* comerciais (conhecidos geralmente por galerias API). Os testes mais frequentemente realizados e respectivos resultados para a identificação de *C. neoformans* encontram-se listados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4 - Testes mais comuns utilizados na identificação de *Cryptococcus neoformans* e resultados correspondentes.

Assimilação de Compostos de Carbono:

Glucose +	D-Arabinose +,-	Celobiose +,-	Ribitol +,-	Inositol +
Galactose +	L-Ramnose +,-	Melibiose -	Glicerol +,-	D,L-Lactato +,-
L-Sorbose +,-	Sacarose +	Lactose -	Eritritol +,-	Succinato +,-
D-Ribose +D ^a	Maltose +	Rafinose +,-	D-Glucitol +D	Citrato +,-
D-Xilose +	Salicina +,-	Amido +D	D-Manitol +	Metanol -
L-Arabinose +,-	Trealose +	Melezitose +	Galactitol +,-	Etanol +,-

Fermentação de hidratos de carbono: -

Assimilação de Compostos de Azoto:

Nitrato -	Cadaverina +,-	D-Glucosamina -	D-Triptofano +,-
Nitrito -	Creatinina +,-	Imidazole -	

Outros testes:

Urease +	Crescimento a 37°C +
Crescimento em meio com ciclo-heximida -	Melanização +
Produção de tubos germinativos -	

Legenda: ^a D -tardia.

1.4.4. Outros Métodos de Diagnóstico

Para além do exame microscópico directo e do isolamento em cultura, podem ser igualmente feitas colorações para a visualização *in vivo* de *C. neoformans* nos tecidos (em biópsias de pele, pulmão, osso, etc.) utilizando técnicas diversas como as de Gomori-Grocott, PAS (*Periodic Acid Schiff*), hematoxilina-eosina, Gram, Papanicolau ou mucicarmina (Gurri 1950).

Habitualmente, as células de *C. neoformans* têm forma globosa nos tecidos, podendo eventualmente apresentar-se com forma oval, e não induzem reacção tecidular. As células de *C. neoformans* var. *gattii* têm em geral forma mais alongada. No entanto, durante os processos de coloração as amostras são desidratadas, fixadas ao calor e coradas e as células podem rebentar ou mirrar o que dificulta a sua identificação. A alteração da morfologia das células é frequente nas preparações histológicas e torna-se possível confundir as células de *C. neoformans* com as de outros fungos, nomeadamente com as de *Blastomyces dermatitidis* (Moser *et al.* 1978).

As técnicas imagiológicas, tomografia axial computadorizada (TAC) e ressonância magnética nuclear (RMN), podem ser usadas no diagnóstico do envolvimento meningoencefálico, nomeadamente para a detecção de complicações como a hidrocefalia, lesão ocupando espaço, atrofia cortical difusa ou edema cerebral. Quando há suspeita clínica, a radiografia do tórax permite o diagnóstico em mais de 50% dos casos apesar da ausência de especificidade das lesões observadas.

1.5. OBJECTIVOS DO TRABALHO E PLANO DA DISSERTAÇÃO

O presente trabalho teve três objectivos principais: (i) proceder a uma caracterização fenotípica de isolados clínicos de *C. neoformans*, apreciando características menos convencionais mas eventualmente relevantes para a virulência das estirpes; (ii) desenvolver um método molecular de identificação da levedura de interesse médico *C. neoformans* que permitisse uma identificação mais rápida e fiável do que a actualmente praticada nos laboratórios de microbiologia clínica, e (iii) desenvolver um método de detecção molecular

directa de *C. neoformans* nos produtos biológicos, evitando o isolamento da levedura em cultura pura e reduzindo o respectivo tempo e custos associados.

No capítulo introdutório faz-se uma breve revisão dos estudos até agora realizados sobre vários aspectos relacionados com a levedura patogénica oportunista em análise, nomeadamente aspectos ecológicos, factores de virulência, epidemiologia e clínica das infecções criptocócicas. São ainda referidos os métodos utilizados no diagnóstico laboratorial da criptococose.

O segundo capítulo contém os resultados obtidos relativamente às características macro e micromorfológicas, fisiológicas e bioquímicas de um conjunto representativo de isolados clínicos e ambientais. Entre as características morfológicas, foram apreciadas a cor e aspecto das colónias, a produção de pseudomicélio ou micélio e o aspecto microscópico das células, incluindo a observação da cápsula. Na perspectiva fisiológica foram analisados os padrões de assimilação de compostos de carbono e de azoto e determinada a temperatura máxima de crescimento de todas as estirpes seleccionadas. No que diz respeito à caracterização bioquímica desta espécie, começou por ser aplicado o teste CGB que avalia a sensibilidade à L-canavanina e assimilação da glicina, na presença do indicador Azul de Bromotimol, com o objectivo de diferenciar as duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. Seguiu-se a determinação do serotipo de cada estirpe, a capacidade de melanização à temperatura ambiente e a 37°C e, finalmente, a capacidade de produção de urease e de enzimas proteolíticas utilizando diferentes substratos.

O terceiro capítulo incide na identificação molecular de *C. neoformans*. Avaliou-se a utilidade para o diagnóstico laboratorial da criptococose de um método descrito por Fell (1995) e baseado na amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando um *primer* específico, de um fragmento da região D1/D2 do gene de rRNA 26S. Como aquele autor tinha experimentado apenas a estirpe-tipo da espécie, o passo inicial desta fase do trabalho consistiu na aplicação do método a 51 estirpes identificadas fenotipicamente como *C. neoformans* (71% com origem em doentes com SIDA). Para validar os resultados obtidos foi necessário certificar a identificação dos isolados através dos métodos moleculares usualmente utilizados em leveduras (determinação do conteúdo em guanina e citosina do genoma, cinética de reassociação DNA-DNA e sequenciação do domínio D1/D2 do rDNA 26S). O capítulo inclui ainda uma análise da possibilidade de diferenciar estirpes através do estudo de polimorfismos de regiões mini/microsatélites do genoma e dos fragmentos de

restrição de regiões intergénicas do rDNA. Esta análise visou futuros estudos de epidemiologia molecular da criptococose.

No quarto capítulo descreve-se a aplicação de dois métodos de detecção directa de *C. neoformans* em produtos biológicos. O método de identificação molecular validado no presente trabalho foi aplicado ao DNA total extraído de amostras biológicas propositadamente infectadas com *C. neoformans* e, por outro lado, são apresentadas experiências de hibridação *in situ* com uma sonda fluorescente desenhada com base num fragmento de DNA específico para *C. neoformans*. Este estudo comparativo teve como objectivo o diagnóstico directo da criptococose, sem ser necessário passar pelo isolamento da levedura em cultura, tendo em conta os parâmetros rapidez de resposta, sensibilidade e custo.

No quinto e último capítulo são tecidas considerações de carácter global sobre os resultados obtidos no decurso do trabalho. Por fim, são apresentadas algumas perspectivas de estudos futuros sobre aspectos relacionados com o tema desta dissertação, tendo em consideração o estado actual de conhecimentos nesta área da microbiologia.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

2.1. INTRODUÇÃO

De um modo geral, estirpes de uma mesma espécie são caracterizadas por terem caracteres fenotípicos semelhantes e a informação sobre as suas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e, por vezes, ecológicas permite situar um organismo no grupo a que pertence. Frequentemente, são as propriedades fenotípicas que permitem uma primeira diferenciação dos taxa nos diferentes níveis hierárquicos. Apesar da enorme importância adquirida nas últimas décadas pela caracterização molecular na sistemática de microrganismos, pelo seu elevado poder de resolução e grau de fiabilidade, os métodos fenotípicos convencionais continuam a ser indispensáveis por permitirem uma caracterização completa das espécies e uma análise comparativa integrada com os grupos mais próximos.

Os primeiros trabalhos de caracterização fenotípica da levedura *Cryptococcus neoformans* incluíram o estudo das características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas, fermentação de açúcares, reacções serológicas e patogenicidade para os animais (Benham 1935).

Seeliger (1956) introduziu o teste da urease na identificação rápida dos *Cryptococcus* e Staib (1962) descobriu que *C. neoformans* produzia pigmento castanho quando crescia em cultura num meio que continha extractos de *Guizotia abyssinica* (sementes de Niger).

Foi uma característica morfológica que levou Shadomy e Utz (1966) a classificar *C. neoformans* entre os fungos basidiomicetas e foi com base em características fenotípicas que Vanbreuseghem e Takashio (1970) propuseram a nova variedade *C. neoformans var. gattii*. Actualmente, as características fenotípicas das duas variedades desta espécie estão bem definidas (Kurtzman & Fell 1998), embora a caracterização molecular esteja a questionar esta distinção. O diagnóstico laboratorial de *C. neoformans* nos laboratórios de microbiologia clínica ainda se faz por observação da morfologia das células e das colónias, pela capacidade de crescer à temperatura de 37°C e através dos padrões de assimilação de

diferentes compostos. Em seguida serão abordadas algumas das características fenotípicas de *C. neoformans* consideradas mais relevantes para este trabalho.

2.1.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

MACROMORFOLOGIA

Quando se desenvolve em meio sólido, *C. neoformans* produz colónias opacas, planas, de margem lisa, cremosas ou mucosas. A cor das colónias é inicialmente branca ou creme, tornando-se mais ou menos acastanhada com o tempo, dependendo das estirpes.

O grau de mucosidade das culturas está directamente relacionado com a produção de cápsula pelas células. Nas culturas mais mucosas, ao fim de uma semana de crescimento, forma-se um sedimento no fundo dos tubos com meio inclinado ou, em placas de Petri, as colónias coalescem e o muco pode escorrer para a tampa das placas invertidas.

MICROMORFOLOGIA

Na observação de amostras de produtos biológicos infectados ao microscópio óptico, as células de *C. neoformans* aparecem como leveduras encapsuladas, de forma redonda ou oval, reproduzindo-se por gemulação. As células medem geralmente entre 4 a 6 μm de diâmetro, sendo possível apresentarem uma certa heterogeneidade na sua dimensão e forma.

A cápsula polissacarídea é a característica mais evidente que distingue as células de *C. neoformans* de todas as outras leveduras de interesse clínico. Quando se contrasta a suspensão celular numa preparação com Tinta da China ou Nigrosina, as células e a cápsula não coram (Weidman & Freeman 1924), pelo que se observa um fundo negro e, contornando a célula leveduriforme, uma área clara cujas dimensões podem variar desde 1 μm até >30 μm (Williamson *et al.* 1996). Nos isolados de ambientes naturais, as células tendem a ser mais pequenas e com uma cápsula muito reduzida (Farhi *et al.* 1970, Neilson *et al.* 1977). Todos os isolados clínicos produzem cápsulas. A maioria das estirpes produz cápsulas maiores quando parasitam tecidos do que em cultura, fenómeno que parece estar relacionado com o aumento da tensão de CO_2 nos tecidos e/ou com factores nutricionais (Granger *et al.* 1985).

A cápsula pode ainda ser observada (Fig. 2.1) por meio de reacções capsulares resultantes da ligação de anticorpos aos polissacáridos que a compõem (Evans 1959, *idem* 1960, Mukherjee *et al.* 1995), por imunofluorescência (Pidcoe & Kaufman 1968) e utilizando microscopia electrónica (Al-Doory 1971, Sakaguchi *et al.* 1993, Takeo *et al.* 1973).

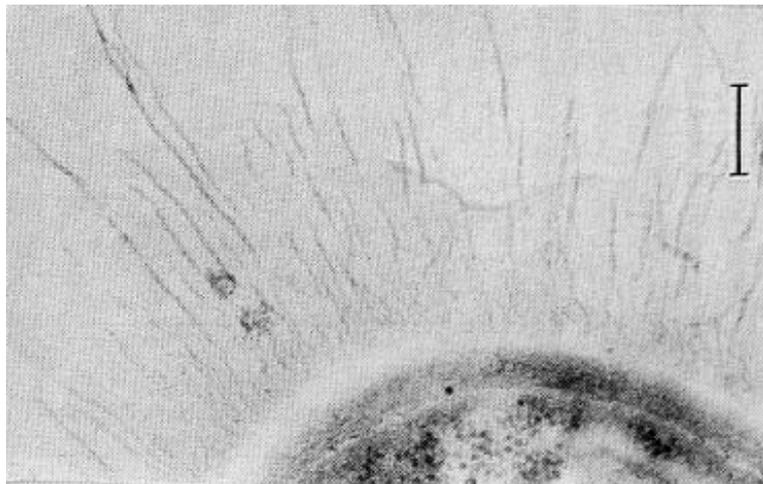


Fig. 2.1 - Estrutura da cápsula polissacarídea (Golubev 1991). A barra corresponde a 0,2 µm.

No citoplasma pode-se observar grânulos que aumentam em número com o envelhecimento das células (Crone *et al.* 1937). Os grânulos podem ser corados com Negro de Sudão, o que indica terem uma composição lipídica (Negrone & Negrone 1951, Reeves & Hammack 1941).

As células dos isolados de *C. neoformans* var. *gattii* podem ter, para além das formas globosas, outras em forma de limão. A 37°C as células desta variedade tornam-se mais alongadas, com forma de bastonete. Habitualmente não se observa nem pseudomicélio nem micélio no estado haplóide que corresponde a *C. neoformans*.

Embora na grande maioria das amostras clínicas predominem as formas leveduriformes, na literatura vem igualmente referenciada a observação ocasional de células de *C. neoformans* com morfologias diferentes: presença de tubos germinativos, formas filamentosas e pseudohifas (Lurie & Shadomy 1971, Neilson *et al.* 1978, Shadomy & Lurie 1971, Williamson *et al.* 1996).

Erke e Schneidau (1973) colocaram a hipótese das estirpes que desenvolviam micélio não pertencerem a *C. neoformans*. Através de experiências de reassociação DNA-DNA verificaram que a hipótese não se confirmava e que as estirpes que apresentavam formas diferentes pertenciam à mesma espécie.

A formação de hifas depende da estirpe e das condições de crescimento e muito raramente se observam estas formas em amostras clínicas (Freed *et al.* 1991, Williamson *et al.* 1996). Lurie e Shadomy (1971) fizeram referência a este aspecto em dois casos de autópsia, identificando tubos germinativos e hifas septadas nos tecidos infectados por *C. neoformans*. Freed *et al.* (1991) descreveram o caso de um doente com leucemia em que foi observado micélio no exame directo do LCR, embora em cultura unicamente se desenvolvessem células leveduriformes. Apesar de não se ter observado maior virulência em estirpes de *C. neoformans* produtoras de pseudofilamentos (Neilson *et al.* 1981), o desenvolvimento de pseudohifas pode representar um aumento da aderência e da capacidade de sobrevivência do fungo em relação a certas condições ambientais (Phan *et al.* 2000). A ocorrência de formas atípicas aumenta a probabilidade de, em exames directos de amostras biológicas, *C. neoformans* poder ser confundido com outros fungos patogénicos (Williamson *et al.* 1996).

2.1.2. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS

C. neoformans cresce bem na grande maioria dos meios de cultura para fungos com as adequadas fontes dos diversos elementos (Bruatto *et al.* 1992). Esta levedura pode ser cultivada em meios muito simples pois é pouco exigente quanto à presença de aminoácidos, açúcares, lípidos ou vitaminas específicos (Vidotto *et al.* 1996). *C. neoformans* tem a capacidade de sintetizar todos os aminoácidos essenciais a partir de amónia na presença de hidratos de carbono ou de outros compostos orgânicos que funcionem como fonte de carbono e de energia (Littman 1958). A possibilidade de utilizar compostos simples, de baixo peso molecular, como fonte de carbono ou de azoto é consistente com o facto de ser um organismo livre adaptado à sobrevivência em nichos ecológicos múltiplos. No entanto, este fungo necessita sempre da presença de ferro no meio (Jacobson & Vartivarian 1992, Vartivarian *et al.* 1995) e de baixas concentrações de tiamina (Littman 1959).

As variedades *neoformans* e *gattii* diferem em várias características fisiológicas:

- Na capacidade de assimilar os ácidos L-málico, fumárico e succínico. Por exemplo, a taxa de assimilação de ácido L-málico é cerca de dez vezes maior na var. *gattii* quando comparada com a var. *neoformans* (Bennett *et al.* 1978).

- Ambas as variedades utilizam creatinina como fonte de azoto (Kwon-Chung *et al.* 1978), mas na var. *neoformans* a amónia que resulta da degradação da creatinina por acção da creatinina desaminase inibe a síntese da enzima, enquanto na var. *gattii* este mecanismo de regulação não parece estar presente (Polacheck & Kwon-Chung 1980)

- As duas variedades diferem ainda na capacidade de usar a glicina como fonte de carbono e de azoto. A maioria dos isolados da variedade *gattii* assimilam glicina, enquanto somente uma pequena percentagem dos classificados na variedade *neoformans* o faz. Os isolados da variedade *neoformans* que assimilam glicina são sensíveis à ciclo-heximida na concentração de 1,6 µg/ml. Como os isolados da variedade *gattii* são resistentes a esta concentração do antibiótico, foi utilizado o meio de cultura de glicina/ciclo-heximida com vermelho de fenol como indicador para distinguir as duas variedades (Salkin & Hurd 1982). Posteriormente, verificou-se que este meio originava cerca de 11% de resultados falsos negativos.

- O crescimento diferencial das duas variedades na presença de canavanina e de glicina permite distinguir *C. neoformans* var. *gattii* de *C. neoformans* var. *neoformans* em 2 a 5 dias. Esta diferença constitui a base do chamado teste CGB, sigla associada aos componentes do meio sólido em que é efectuado o teste: canavanina, glicina e azul de bromotimol (Kwon-Chung *et al.* 1982b).

Também foi sugerido que a assimilação de D-prolina pudesse ser usada para distinguir as variedades de *C. neoformans* (Dufait *et al.* 1987), mas este método é menos discriminatório do que o agar de CGB (Nishikawa *et al.* 1996).

As estirpes das duas variedades também mostraram diferenças na susceptibilidade à actividade *killer* de *Cryptococcus laurentii* (Boekhout *et al.* 1997) e aos agentes antifúngicos. De um modo geral, as estirpes da var. *gattii* parecem ser menos sensíveis ao antifúngico 5-fluorocitosina do que as estirpes da var. *neoformans* (Shadomy *et al.* 1987).

Termotolerância

A capacidade de sobreviver e de se multiplicar à temperatura de 37°C, temperatura interna dos mamíferos, é uma característica comum dos agentes patogénicos invasivos.

Geralmente, *C. neoformans* tem um taxa específica de crescimento mais baixa do que leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* ou as espécies conhecidas de *Candida* nas mesmas condições. Em meios de cultura ricos em nutrientes e a 35-37°C o número de células, na fase exponencial de crescimento, duplica ao fim de 2,5 a 6 horas, dependendo das estirpes (Casadevall & Perfect 1998, Miller *et al.* 1990).

De um modo geral, *C. neoformans* tem uma temperatura óptima e máxima de crescimento de, respectivamente, 30°C e 39-40°C (Howard 1961, Kwon-Chung 1991, Littman & Borok 1968, Van Uden *et al.* 1958). Temperaturas superiores a esta última inibem e podem matar o fungo. Incubações curtas a 40-42°C não têm um efeito significativo na viabilidade da cultura (Rosas & Casadevall 1997), mas uma incubação prolongada é letal: as culturas são esterilizadas quando são incubadas a 40°C durante 6 dias ou a 41°C durante 4 dias (Kligman & Weidman 1949). *C. neoformans* var. *gattii* é mais sensível às temperaturas elevadas e todas as estirpes examinadas morreram rapidamente quando expostas a uma temperatura ambiente de 40°C (Casadevall & Perfect 1998).

Outras condições de cultura

C. neoformans tem a capacidade de crescer entre pH 4 e pH 7,3, preferindo meios moderadamente ácidos, pH 5-6,5 (Mosberg & Alvarez-Dechoudens 1951). O crescimento é significativamente inibido a valores elevados de pH (acima de pH 7,5), nomeadamente em meios contendo soro humano (Howard 1961, Littman 1958). No entanto, verificou-se que o efeito do pH está relacionado com a temperatura de incubação e com a concentração da fonte de carbono: a levedura é mais sensível a valores elevados de pH a temperaturas superiores a 30°C e com baixas concentrações de glucose (Howard 1961). É provável que estes factores limitantes impeçam a proliferação de *C. neoformans* no sangue do hospedeiro, *in vivo*. Por outro lado, a alcalinização pode ser usada para esterilizar ambientes contaminados (Walter & Coffee 1968).

O nível de humidade requerido para a sobrevivência de *C. neoformans* depende do ambiente em que se encontra. *C. neoformans* pode permanecer viável durante mais de um ano em excrementos desidratados de pássaro (Littman & Borok 1968). Contudo, a falta de humidade em outros ambientes (p.e. ambientes expostos à radiação solar directa) leva a uma diminuição significativa da viabilidade desta espécie (Ruiz *et al.* 1982a, *idem* 1982b).

C. neoformans tem um metabolismo aeróbio e não tem capacidade de crescer em condições de anaerobiose. Como nas condições de parasitismo a tensão de CO₂ nos tecidos do hospedeiro é elevada (passa de 0,04 para 5% p/v), muitas estirpes activam a síntese de cápsula e diminuem o número de ciclos de replicação para conseguirem sobreviver (Granger *et al.* 1985). O oxigénio é um nutriente crítico para o crescimento de *C. neoformans*. Odds *et al.* (1995) observaram diferenças significativas nas taxas de crescimento de culturas de *C. neoformans* quando estas se realizavam em recipientes com alturas diferentes e sugeriram que era a falta de oxigénio que condicionava o crescimento. A adição de H₂O₂ aos frascos de hemocultura aumenta a probabilidade de isolamento de *C. neoformans*, talvez pelo fornecimento de uma fonte adicional de oxigénio (Huahua *et al.* 1991).

A luz solar pode igualmente esterilizar locais contaminados com *C. neoformans* (Ishaq *et al.* 1968). Foi demonstrado que a radiação UV é letal para *C. neoformans*, tal como para a quase totalidade dos microrganismos (Wang & Casadevall 1994a).

2.1.3. - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Composição e reactividade da cápsula

A cápsula de *C. neoformans* consiste numa camada mucosa imediatamente no exterior da parede celular e é essencialmente composta por polissacáridos, embora também contenha proteínas. O polissacárido principal, de elevado peso molecular, tem um esqueleto de unidades de α -1,3-D-manopiranosose com ramificações simples de β -D-xilopiranosil e β -D-glucuronopiranosil (Bhattacharjee *et al.* 1984, Casadevall & Perfect 1998, Cherniak & Sundstrom 1994).

As técnicas de microscopia electrónica permitem observar que a cápsula consiste de microfibrilas que irradiam da superfície exterior da parede celular (Fig. 2.1). A cápsula de *C. neoformans* é composta por fibrilas longas e finas (0,3-0,4 nm de diâmetro), que se podem entrecruzar. A orientação radial dos polissacáridos capsulares contrasta com a orientação tangencial observada para os polissacáridos da parede celular (Golubev 1991). Estudos realizados sobre a ligação dos anticorpos a *C. neoformans* indicam que a arquitectura da cápsula tem uma distribuição antigénica complexa e heterogénea (Casadevall & Perfect 1998).

Os compostos da cápsula têm sido exaustivamente estudados por técnicas serológicas e por ressonância magnética. O aperfeiçoamento das técnicas tem permitido obter as várias fracções polissacarídeas: glucuronoxilomanano (GXM), galactomanano (GalXM) e manoproteína (MP).

O GXM constitui cerca de 90% do polissacárido capsular e as diferenças na sua estrutura (número de ramificações, proporção relativa de xilose e ligações O-acetil) originam diferenças antigénicas que servem de base à separação clássica das estirpes de *C. neoformans* em quatro serotipos A, B, C e D (Cherniak e Sundstrom 1994, Evans 1949, Evans & Kessel 1951, Wilson *et al.* 1968). A diversidade estrutural do GXM tem sido estudada por vários autores, inclusive em estirpes do mesmo serotipo para as quais se encontram variações estruturais significativas do GXM (Bhattacharjee *et al.* 1984, Cherniak *et al.* 1991, *idem* 1995, Todaro-Luck *et al.* 1989).

A contribuição do GalXM e da MP para a estrutura capsular não é tão clara. Estes componentes parecem estar mais relacionados com a parede celular do que com a própria cápsula (Cherniak & Sundstrom 1994, James & Cherniak 1992, Vartivarian *et al.* 1989)

Como já foi referido, as dimensões da cápsula dependem da estirpe e das condições ambientais, sendo a sua produção frequentemente estimulada por condições menos favoráveis para o crescimento de *C. neoformans* (Dykstra *et al.* 1977, Littman 1958, Vartivarian *et al.* 1993).

A maioria das estirpes possui uma cápsula maior durante a infecção do que em meio de cultura laboratorial. A transferência de *C. neoformans* de culturas em meio de Sabouraud para infecções experimentais no ratinho estimulou o aumento da dimensão da cápsula (Bergman 1965, Farhi *et al.* 1970). Não é frequente observar-se directamente nos tecidos *C. neoformans* com cápsulas pequenas, e a observação de estirpes acapsuladas, ou com cápsula reduzida, em amostras provenientes de doentes com SIDA ainda permanece controversa (Bottonne *et al.* 1986, Farmer & Komorowski 1973)

Apesar da cápsula ser necessária para um aumento da patogenicidade, sabe-se que por si só é insuficiente para produzir doença clínica (Dykstra *et al.* 1977). Outros trabalhos demonstraram claramente que não existia uma correlação directa entre a presença e as dimensões da cápsula e a virulência das estirpes (Littman & Tsubura 1959). Há referências

clínicas de que estirpes acapsuladas ou hipocapsuladas de *C. neoformans* produziram infecções humanas (Bottone *et al.* 1985, Farmer & Komorowski 1973, Lacaz *et al.* 1993).

Serologia

A classificação dos serotipos baseia-se nas diferenças antigénicas das estirpes de *C. neoformans* quando as células são colocadas em presença de anticorpos específicos (Ikeda *et al.* 1985). A classificação das estirpes de *C. neoformans* em serotipos foi muito útil para a compreensão da epidemiologia global das infecções criptocócicas (Bennett *et al.* 1977, *idem* 1978, Kwon-Chung & Bennett 1984a, *idem* 1984b, Kwon-Chung *et al.* 1992b).

A definição dos três primeiros serotipos (A, B e C) foi baseada em reacções de aglutinação e precipitação em soro imunizado de coelho (Evans 1949, *idem* 1950, Evans & Kessell 1951). Mais tarde, Wilson *et al.* (1968) descreveram o serotipo D. O quinto serotipo (AD) foi descrito por Ikeda *et al.* (1985) e inclui o conjunto de estirpes que têm determinantes antigénicos comuns aos serotipos A e D.

Inicialmente, foram desenvolvidos diferentes métodos para a determinação dos serotipos de *C. neoformans*, tais como os que envolviam reacções de aglutinação, reacções capsulares, imunoprecipitação e imunofluorescência (Evans 1960, Ikeda *et al.* 1996, Kaplan *et al.* 1981, Wilson *et al.* 1968).

Os trabalhos clássicos de serotipagem utilizaram soro imunizado de coelho porque este animal experimental tem uma resposta imunitária forte e constante às preparações de polissacárido criptocócico. Mais recentemente, utiliza-se uma variedade de ratinho para a produção de anticorpos monoclonais a partir de epitopos polissacarídeos capsulares de *C. neoformans* (Dromer *et al.* 1987, Eckert & Kozel 1987, Ikeda *et al.* 1996, Pirofski *et al.* 1995, Spiropulu *et al.* 1989). Das dezenas de anticorpos monoclonais produzidos, a maior parte reage com mais do que um serotipo. Somente aqueles que tinham uma reactividade muito mais elevada com um dos serotipos é que foram seleccionados para diagnóstico.

Ikeda *et al.* (1982) caracterizaram os padrões antigénicos dos cinco serotipos de *C. neoformans*. Prepararam oito factores antigénicos para, através de testes de aglutinação, ser possível identificar os serotipos de isolados clínicos e ambientais (Tabela 2.1). Simultaneamente, determinaram a distribuição destes factores antigénicos em relação a cinco outras espécies de *Cryptococcus* e duas espécies de *Candida* que também podem ser

isoladas de infecções humanas. Avaliou-se, para cada serotipo, a presença ou a ausência de reacção com cada um desses oito factores antigénicos. A leitura dos resultados tem a vantagem de poder ser feita visualmente.

Os factores antigénicos 1, 5, 6, 7 e 8 são suficientes para discriminar os cinco serotipos (Tabela 2.1). Os factores antigénicos desenvolvidos por Ikeda *et al.* (1982) para a determinação dos serotipos de *C. neoformans* constituem a base de um *kit* actualmente comercializado (Crypto Check Iatron[®], Laboratórios Iatron, Tóquio, Japão).

Tabela 2.1 - Padrões antigénicos de *Cryptococcus neoformans*, segundo Ikeda *et al.* (1982).

Serotipos	Reactividade dos factores séricos de <i>C. neoformans</i>							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	+	+	-	-	-	+	-
B	+	+	-	+	+	-	-	-
C	+	-	-	+	-	+	-	-
D	+	+	+	-	-	-	-	+
AD	+	+	+	-	-	-	+	+

Deve-se, porém, salientar que o polissacárido capsular de *C. neoformans* pode apresentar semelhanças antigénicas com outros organismos. Podem surgir reacções cruzadas com *Streptococcus pneumoniae* (Rebers *et al.* 1958) e *Klebsiella* (Maccani 1977). O polissacárido capsular de *Cryptococcus albidus* var. *albidus* também tem determinantes antigénicos muito semelhantes aos de *C. neoformans* serotipo A (Ikeda *et al.* 1991). Os anticorpos para o polissacárido capsular de *C. neoformans* também se ligam ao polissacárido sintetizado por *Trichosporon beigellii* (Devi *et al.* 1996, McManus & Jones 1985, Melcher *et al.* 1991). Esta reacção cruzada entre *C. neoformans* e *Trichosporon* tem importância clínica no teste de pesquisa do antígeno com partículas de latex, tão utilizado no diagnóstico serológico da criptococose, pois observa-se igualmente uma reacção positiva no caso de uma tricosporonose disseminada (Melcher *et al.* 1991, Nishiura *et al.* 1997).

Relativamente às diferenças serológicas entre as duas variedades, os isolados dos serotipos A, D ou AD pertencem à variedade *neoformans* enquanto que as estirpes de serotipo B ou C pertencem à variedade *gattii*.

Teste CGB

Os isolados da variedade *gattii* hidrolisam a glicina e são resistentes à L-canavanina. O desenvolvimento das colónias conduz a uma subida do pH do meio de cultura e a cor do indicador utilizado vira para azul. A resistência desta variedade à canavanina deve-se à sua conversão num produto não tóxico (Polacheck & Kwon-Chung 1986). Contrariamente, a maioria dos isolados de *C. neoformans* var. *neoformans* é sensível à canavanina e não é capaz de utilizar a glicina como única fonte de carbono e azoto. Não havendo crescimento, o meio permanece com a cor inicial amarela esverdeada (Kwon-Chung *et al.* 1982b, Min & Kwon-Chung 1986). No entanto, alguns isolados do serotipo A da variedade *neoformans* são capazes de assimilar a glicina e são resistentes à L-canavanina (Min & Kwon-Chung 1986) o que dá origem a falsos positivos.

Melanização

Outra das características peculiares de *C. neoformans* é a sua capacidade de sintetizar pigmentos escuros, do tipo melanina, quando cresce em meios com compostos fenólicos. A descoberta da produção de pigmento por *C. neoformans* deve-se a Staib (1962) que observou o aparecimento de colónias castanhas quando esta levedura crescia em meio contendo extracto de sementes de *Guizotia abyssinica* vulgarmente utilizadas na alimentação dos pássaros. Esta característica passou, então, a ser usada no diagnóstico de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* (Korth & Pulverer 1971, Shaw & Kapica 1972, Strachan *et al.* 1971). Apesar de outras espécies do género *Cryptococcus* produzirem igualmente pigmentos quando cultivadas em meios adequados, a síntese de pigmento por *C. neoformans* é mais rápida e intensa (Chaskes & Tyndall 1978).

As melaninas são compostos hidrofóbicos de peso molecular elevado, carregadas negativamente e insolúveis em solventes aquosos e orgânicos. Formam-se por polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos. São habitualmente de cor negra ou escura. *C. neoformans* não é capaz de sintetizar melanina sem a presença de um precursor exógeno como, por exemplo, D,L-3,4-di-hidroxifenilalanina (D,L-DOPA) ou epinefrina, contrariamente ao que ocorre na maioria dos fungos que também sintetizam melanina (Casadevall *et al.* 2000).

A síntese de melanina é catalisada pela enzima fenol-oxidase que foi classificada como sendo uma lacase (Williamson 1994). A enzima é uma proteína glicosilada contendo cobre e 624 aminoácidos, podendo existir sob a forma dimérica (Ikeda *et al.* 1993). Os iões

de cobre e de ferro aumentam a actividade da enzima fenol-oxidase (Jacobson & Compton 1996). É interessante observar a existência de uma regulação discordante entre a cápsula polissacarídea e a actividade fenol-oxidásica, pois na presença de ferro a produção de polissacárido da cápsula diminui enquanto a actividade fenol-oxidásica é estimulada.

A capacidade de *C. neoformans* produzir pigmento também depende da fonte de azoto presente no meio de cultura. As duas variedades de *C. neoformans* diferem na regulação da actividade fenol-oxidásica. Verificou-se que o ácido glutâmico suprime a actividade fenol-oxidásica de todos os isolados, excepto a das estirpes do serotipo B, enquanto o ião amónio suprime a actividade nos isolados do serotipo A (Nurudeen & Ahearn 1979).

O tipo de pigmento sintetizado varia com a estrutura química do substrato. Os substratos contendo *o*-difenois fazem com que sejam produzidos pigmentos escuros que se depositam na parede celular, enquanto os substratos contendo *p*-difenois originam a síntese de pigmentos solúveis que se difundem no meio de cultura (Chaskes & Tyndall 1975). A cor do pigmento também depende do substrato. L-DOPA dá origem a um pigmento negro, enquanto outras substâncias podem levar à produção de pigmentos verdes menos escuros, castanhos ou alaranjados (Chaskes & Tyndall 1975). Verificou-se que debris celulares contendo melanina apresentavam a mesma reactividade que as células melanizadas *in vivo* e estimulavam a produção de anticorpos específicos para a melanina fúngica, provando que durante a infecção as células de *C. neoformans* habitualmente produzem melanina (Wang *et al.* 1996).

As estirpes selvagens de *C. neoformans* produtoras de melanina são mais virulentas do que os seus mutantes albinos (Kwon-Chung & Rhodes 1996, Kwon-Chung *et al.* 1982c, Rhodes *et al.* 1982). Como a melanina tem uma carga fortemente negativa, a melanização aumenta significativamente a carga negativa das células capsuladas de *C. neoformans* (Nosanchuck & Casadevall 1997), protegendo-as dos agentes oxidantes do hospedeiro (Nyhus *et al.* 1997).

Teste da urease

A urease, produzida por todas as leveduras basidiomicetas, é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da ureia em amónia e carbamato e conduz a um aumento de pH do meio envolvente. De entre todos os fungos habitualmente patogénicos ao homem, somente *C.*

neoformans produz urease e esta característica tem sido utilizada no diagnóstico rápido deste agente (Ellis 1994, Zimmer & Roberts 1979).

A presença desta enzima foi inicialmente descrita em *C. neoformans* por Seeliger (1956) e não parece estar muito directamente implicada na patogénese das infecções. No entanto, é provável que a libertação de amónia induzida pela acção da urease contribua para a destruição da função do complemento no hospedeiro, afectando o processo patogénico envolvido na criptococose (Cox *et al.* 2000).

A actividade ureásica das duas variedades de *C. neoformans* difere se os isolados forem testados rapidamente em meio líquido com ureia após terem crescido em meio sólido contendo um agente quelante como o EDTA. O EDTA inibe a produção de urease em *C. neoformans* var. *gattii*, mas não em *C. neoformans* var. *neoformans* (Kwon-Chung *et al.* 1987). A variedade *neoformans* tem uma reacção positiva ao fim de 1 a 4 horas, enquanto que não ocorre reacção alguma com a variedade *gattii* após o mesmo tempo.

Actividade proteolítica

As enzimas proteolíticas contribuem para a virulência dos microorganismos, destruindo as células do hospedeiro, as proteínas séricas (Müller & Sethi 1972) e proteínas importantes do sistema imunitário, como os anticorpos e as do complemento (De Bernardis *et al.* 1999, Kaminishi *et al.* 1995, Kwon-Chung *et al.* 1985, Neelly & Holder 1990).

As enzimas proteolíticas, ou proteases, hidrolisam as ligações peptídicas e manifestam uma especificidade mais ou menos marcada no que diz respeito à posição da ligação peptídica na cadeia e à natureza dos aminoácidos envolvidos nessa ligação. Para uma hidrólise rápida e eficaz das proteínas do hospedeiro é necessária a participação de vários tipos de proteases susceptíveis de atacar a cadeia polipeptídica em pontos diferentes. Assim, pela acção das endopeptidases sintetizadas pelo microrganismo, ocorre a hidrólise das ligações peptídicas no interior das cadeias proteicas do hospedeiro, originando uma mistura de péptidos de tamanhos variáveis e de alguns aminoácidos livres. Estes péptidos ficam, deste modo, sob a acção das exopeptidases que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas na extremidade das cadeias, libertando o aminoácido N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) (Neurath 1989).

Salkowski e Balish (1991) estudaram a histopatologia de infecções criptocócicas e observaram que nos tecidos infectados havia degradação das fibras de colagénio e degradação da matriz extracelular. Todavia, as referências quanto à capacidade de *C. neoformans* ter actividade proteolítica extracelular são contraditórias. Staib (1965) estudou 32 estirpes em placas com agar de soro humano e não encontrou nenhuma actividade proteolítica. Outros tentaram a detecção de actividade proteolítica e apenas a encontraram num número reduzido de isolados (Ahearn *et al.* 1968, Federici 1982). No entanto, há autores que consistentemente observaram a produção de proteases em ambas as variedades (Aoki *et al.* 1994, Brueske 1986, Goodley & Hamilton 1993), e até uma serina protease com um peso molecular de 200 kD já foi isolada (Goodley & Hamilton 1993).

C. neoformans é um organismo de vida livre e é possível que possa obter nutrientes a partir de fontes ambientais por acção de enzimas, por si sintetizadas, que degradem proteínas. A produção de enzimas proteolíticas tem sido igualmente referida como tendo um papel muito importante na patogénese de outras leveduras de vida livre, nomeadamente de *Candida albicans* (Fusek *et al.* 1993, Ray *et al.* 1992, Ruchel *et al.* 1992).

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Origem das Estirpes Estudadas

Neste trabalho foram estudadas 51 estirpes de *C. neoformans*: 38 (75%) das estirpes foram isoladas de produtos biológicos infectados e 13 (25%) tinham outras proveniências. As estirpes isoladas, a partir de produtos biológicos infectados, no Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical eram provenientes do Hospital de Egas Moniz, Hospital Militar em Lisboa, Hospital Prisional de Caxias, Hospital de Cascais, Hospital de S. José, Hospital S. Francisco Xavier, Hospital Garcia da Orta, República da Guiné-Bissau e República de Angola. As outras estirpes, amavelmente cedidas para este trabalho, foram isoladas no Laboratório de Bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria, Hospital Curry Cabral e Instituto Português de Oncologia em Lisboa, no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santo António no Porto e no Instituto Pasteur em Paris. Pelo Serviço de Micologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária foram fornecidas duas estirpes isoladas a partir de fezes de pombo (CN 15 e CN 112). As estirpes de referência foram cedidas pela Coleção Portuguesa de Culturas de Leveduras (PYCC - *Portuguese Yeast Culture Collection*), Secção Autónoma de Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Das estirpes com origem em doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (VIH), 29 foram isoladas a partir de líquido cefalorraquidiano (LCR), quatro de biópsias de pele e quatro do sangue. De um doente não infectado pelo vírus VIH foram obtidos dois isolamentos, um a partir do LCR e outro a partir de uma biópsia pulmonar. Três doentes VIH+ deram origem a dois isolados cada: num caso (JA), os isolados foram provenientes de produtos biológicos diferentes no mesmo momento da infecção, e nos outros dois casos (JC e VG) isolados em momentos diferentes da infecção, relacionados com recidivas durante ou após a terapêutica antifúngica. A partir de um mesmo doente (HF), e ao longo de um período de dois anos, foram obtidos oito isolados diferentes de *C. neoformans*.

2.2.2. Isolamento, Identificação e Manutenção das Estirpes

As estirpes provenientes de infecções humanas foram isoladas em cultura após sementeira dos produtos biológicos infectados em meio de Sabouraud (dextrose 4% p/v, peptona 1%, agar 2%) com cloramfenicol (0,5 mg/l) após incubação a 25°C e a 37°C durante 4 a 8 dias. Todos os isolados foram identificados como sendo *C. neoformans* utilizando as galerias ID 32 C[®], BioMérieux. Uma vez isoladas em cultura pura, todas as estirpes foram mantidas em meio de PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) a 4°C e em meio de Sabouraud com 15% (p/v) de glicerol à temperatura de -70°C.

Na Tabela 2.2 estão listadas as estirpes isoladas a partir de produtos biológicos provenientes de doentes com infecção criptocócica e seleccionadas para este trabalho.

Na Tabela 2.3 estão indicadas a estirpe-tipo de *C. neoformans* e outras estirpes, com proveniência diversa, utilizadas como referências. As estirpes PYCC 3528, PYCC 3529, PYCC 3530, PYCC 3533, PYCC 3534, PYCC 3957^T e PYCC 4208 estavam depositadas na *Portuguese Yeast Culture Collection* como *C. neoformans* var. *neoformans* e as estirpes PYCC 5025, PYCC 5026, PYCC 5027 e PYCC 5028 como *C. neoformans* var. *gattii*.

2.2.3. Caracterização Morfológica

As características morfológicas das diferentes estirpes foram estudadas seguindo métodos descritos por Yarrow (1998). A morfologia macroscópica das colónias foi observada em meio de Sabouraud ao fim de uma a duas semanas de incubação a 25°C. A morfologia das culturas em meio líquido, assim como a morfologia microscópica das células, foi observada em meio de YM (extracto de malte 0,3% p/v, extracto de levedura 0,3%, peptona 0,5%, glucose 1%) ao fim de uma semana de incubação a 25°C.

Para todas as estirpes foram feitas as seguintes observações:

- morfologia macroscópica das colónias em meio sólido: cor, textura, superfície, relevo, margem.
- aspecto das culturas em meio líquido: sedimento, anel, película superficial.
- morfologia das células cultivadas em meio líquido: forma, dimensões (média do comprimento e largura de 20 células), modo de reprodução e presença de cápsula.

Tabela 2.2 - Estirpes de *Cryptococcus neoformans* isoladas de infecções humanas e sua origem.

Estirpe	Doente	Infecção	Data	Produto	Origem
CN 2	PL	VIH 1	02-07-1991	LCR	Hosp. Egas Moniz
CN 4	MB	VIH 2	28-04-1992	LCR	Rep. Guiné Bissau
CN 23	RF	VIH 1	20-10-1995	LCR	Hosp. Curry Cabral
CN 24	RM	VIH 1	03-11-1995	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 27	SI	VIH 1	09-11-1995	LCR	Rep. Angola
CN 32	HF 1	VIH 1	12-12-1995	sangue	Hosp. Santa Maria
CN 50	HF 2	VIH 1	17-05-1996	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 59	HF 3	VIH 1	11-09-1996	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 70	HF 4	VIH 1	13-11-1996	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 71	HF 8	VIH 1	13-11-1996	sangue	Hosp. Santa Maria
CN 74	HF 5	VIH 1	20-01-1997	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 83	HF 6	VIH 1	20-02-1997	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 92	HF 7	VIH 1	13-05-1997	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 34	JN	VIH 1	15-12-1995	LCR	Hosp. Militar, Lisboa
CN 38	JA 1	VIH 1	02-02-1996	sangue	Hosp. Santa Maria
CN 40	JA 2	VIH 1	02-02-1996	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 43	M	VIH 1	07-05-1996	LCR	Inst. Hig. Med. Trop.
CN 48	AV	VIH 1	16-05-1996	pele	Hosp. Curry Cabral
CN 49	JC 1	VIH 1	17-05-1996	LCR	Hosp. Santa Maria
CN 52	JC 2	VIH 1	29-05-1996	sangue	Hosp. Santa Maria
CN 54	AB	VIH 1	23-07-1996	LCR	Hosp. Cascais
CN 55	MF	VIH 1	20-08-1996	LCR	Hosp. Stº António
CN 57	SS	VIH 1	12-09-1996	LCR	Hosp. Cascais
CN 65	JB	VIH 1	20-09-1996	LCR	Hosp. Stº António
CN 68	VG 1	VIH 1	23-10-1996	pele	Hosp. Egas Moniz
CN 77	VG 2	VIH 1	07-01-1997	pele	Hosp. Egas Moniz
CN 73	UO	VIH 1	19-11-1996	pele	Hosp. Curry Cabral
CN 79	PS	VIH 1	23-01-1997	LCR	Inst. Pasteur, Paris
CN 80	PT	VIH 1	23-01-1997	LCR	Inst. Pasteur, Paris
CN 87	MG 1	VIH –	24-04-1997	pulmão	Hosp. Stº António
CN 88	MG 2	VIH –	24-04-1997	LCR	Hosp. Stº António
CN 95	AP	VIH 1	14-05-1997	LCR	Hosp. Prisional Caxias
CN 100	RC	VIH 1	24-06-1997	LCR	Hosp. S. José
CN 107	EP	VIH 1	24-10-1997	LCR	Hosp. S. Franc. Xavier
CN 109	NA	VIH 1	12-12-1997	LCR	Hosp. Garcia Orta
CN 118	MS	VIH 1	12-03-1998	LCR	Inst. Port. Oncologia
CN 119	CT	VIH 1	24-03-1998	LCR	Hosp. Prisional Caxias
CN 123	JF	VIH 1	19-08-1998	LCR	Hosp. Santa Maria

Tabela 2.3 - Estirpes de *Cryptococcus neoformans* isoladas de outros ambientes.

Estirpe	N.º CBS	Origem do isolamento
CN 15	-	fezes de pombo
CN 112	-	fezes de pombo
PYCC 3528	CBS 888	-
PYCC 3529	CBS 880	-
PYCC 3530	CBS 887	-
PYCC 3533	CBS 939	-
PYCC 3534	CBS 879	ulceração da face
PYCC 3957 ^T	CBS 132 ^T	sumo de fruta
PYCC 4208	CBS 6886	fezes de pombo
PYCC 5025	-	eucalipto, Austrália
PYCC 5026	-	eucalipto, Austrália
PYCC 5027	-	eucalipto, Austrália
PYCC 5028	-	eucalipto, Austrália

T, estirpe-tipo; PYCC, *Portuguese Yeast Culture Collection*, Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, Portugal; CBS, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda.

A cápsula foi observada fazendo a montagem de uma gota de amostra clínica (LCR, urina, LBA, macerado de biópsia), ou de um pouco de cultura, numa gota de Tinta da China diluída 1:3, previamente colocada numa lâmina de vidro para microscopia.

A observação da produção de pseudomicélio foi feita em placas de Dalmau com meio de agar de milho CMA (*Corn Meal Agar*). As leveduras foram inoculadas, ferindo ligeiramente o meio de cultura, em duas linhas paralelas (com cerca de 3 cm cada e distanciadas 0,5 cm entre si), com um inóculo fraco, e foi colocada uma lamela esterilizada no centro dos inóculos. As culturas foram incubadas a 30°C durante duas semanas e examinadas directamente ao microscópio (Yarrow 1998).

2.2.4. Caracterização Fisiológica

Testes convencionais

Foi estudada a assimilação de vários compostos, como fontes de carbono, utilizando as galerias ID 32 C[®] (BioMérieux) de acordo com as instruções do fabricante.

Temperatura máxima de crescimento

Para a determinação da temperatura máxima de crescimento de cada uma das estirpes em estudo, foram inoculados tubos contendo 5 ml de meio YM (ver Apêndice) com uma gota de uma suspensão aquosa fraca de uma cultura jovem (48-72 horas) em meio de PDA, tendo o cuidado de evitar os falsos positivos devido a excesso de inóculo. Os tubos inoculados foram colocados em banhos termostatizados com temperaturas controladas entre 23°C e 42°C com intervalos de 1°C. As culturas foram agitadas diariamente e as leituras realizadas ao fim de uma semana, utilizando um cartão branco com linhas pretas de cerca de 1mm de espessura. O crescimento visível foi registado como a seguir indicado:

+w	ligeira turvação
+	presença de turvação, mas as linhas são bem nítidas
++	presença de turvação, mas as linhas aparecem difusas
+++	o crescimento não permite a visualização das linhas

A temperatura máxima de crescimento foi considerada como a temperatura à qual a observação correspondia a uma turbidez nítida (+ ou superior).

Sensibilidade à L-canavanina e assimilação de glicina (teste de CGB)

Com uma ansa é feito um inóculo muito fraco no meio de CGB (ver Apêndice) a partir de uma cultura jovem em PDA. As culturas são incubadas à temperatura de 25°C durante 5 dias. As leituras são registadas ao fim de 72 horas e 5 dias. Os isolados resistentes à composição do meio, ao crescerem, fazem virar a cor do meio para azul (*C. neoformans* var. *gattii*). Os isolados sensíveis à L-canavanina e que não assimilam glicina não crescem e o meio mantém a cor amarela esverdeada (*C. neoformans* var. *neoformans*).

2.2.5. Caracterização Bioquímica

Serotipagem

A determinação dos serotipos das estirpes seleccionadas foi feita utilizando o *kit* CRYPTO CHECK IATRON® (Laboratórios Iatron, Tóquio, Japão), seguindo as instruções do fabricante.

Produção de pigmento

A produção de pigmentos do tipo melanina pelas estirpes de *C. neoformans* seleccionadas para este trabalho foi testada em meio sólido com extractos de sementes de Niger e com D,L-DOPA (ver Apêndice). Com uma agulha, foi feito um inóculo fraco da levedura, a partir de uma cultura jovem, em pequenos traços de 0,5 cm na superfície do meio. As culturas foram incubadas a 25°C e a 37° C e a leitura dos resultados foi feita ao fim de 72 horas e duas semanas. As colónias que produzem melanina ficam com uma cor castanha escura.

Produção de urease

Um tubo com meio sólido inclinado contendo ureia e um indicador de pH (meio de Chistensen) foi inoculado com uma cultura pura e incubado uma semana à temperatura ambiente. Se a estirpe produz urease o meio fica carmim.

Actividade proteolítica

A detecção da produção de enzimas proteolíticas por todas as estirpes de *C. neoformans* seleccionadas foi feita em meio sólido com os diferentes substratos proteicos incorporados em meio mínimo (ver Apêndice). Todos os testes foram realizados em placa de Petri excepto a hidrólise da gelatina que foi testada em tubos de ensaio. Todas as culturas foram observadas semanalmente durante 10 semanas.

Hidrólise da caseína

Foi avaliada a hidrólise da caseína em dois meios de cultura diferentes: meio mínimo sólido com 5% (p/v) de caseína pura (BDH Biochemicals) e meio com 5% de leite desnatado (*Skim-Milk*[®]-DIFCO). Com uma agulha, a partir de uma cultura jovem, foi feito um pequeno inóculo circular sobre a superfície do meio. Qualquer dos meios de cultura utilizados tem inicialmente cor creme e é translúcido. A produção de enzimas proteolíticas é detectada através da clarificação do meio. Esta corresponde à degradação da proteína presente no meio de cultura e é visualizada por halos transparentes em torno das colónias que as produzem. Os meios de cultura foram incubados às temperaturas de 25°C e 37°C, durante quatro semanas.

Hidrólise da azocaseína

As estirpes de *C. neoformans* foram cultivadas em meio YM com 0,1% (p/v) de azoalbumina (Sigma) e incubadas a 25°C e a 37°C durante quatro semanas. O inóculo é feito de modo idêntico ao descrito para a hidrólise da caseína. O meio inicialmente é amarelo, ligeiramente turvo, e a actividade proteolítica é detectada através do aparecimento de halos transparentes em torno das colónias.

Hidrólise da gelatina

O meio contendo 10% (p/v) de gelatina (ver Apêndice) é distribuído em tubos de ensaio deixando solidificar sem inclinar. Com uma agulha, foi inoculada uma quantidade muito pequena de levedura em cada tubo picando a superfície do meio até cerca de 0,5 cm de profundidade, na vertical. As culturas foram incubadas à temperatura ambiente durante dez semanas. As proteases produzidas digerem a gelatina o que resulta na liquefacção do meio de cultura (Chen *et al.* 1996a, Yarrow 1998).

Controlo positivo: *Cryptococcus macerans* PYCC 2869^T.

Produção de proteases aspárticas (SAP)

A produção de proteases aspárticas por *C. neoformans* foi testada cultivando as estirpes em meio YCB (*Yeast Carbon Base*) contendo BSA (ver Apêndice). Para cada estirpe testada, foram aplicados inóculos de 10 µl de uma suspensão de 3x10⁶ células/ml a partir de uma cultura jovem. A incubação foi feita a 25°C durante dez semanas. Para observar a degradação da proteína do meio (halos transparentes), foi necessário fazer a coloração com Preto de Amido (0,1% p/v Preto de Amido em ácido acético, metanol e água nas proporções 10:25:65) durante 3 min, seguida de descoloração (ácido acético, metanol e água nas proporções 10:25:65) durante 5 min ou mais.

Controlo positivo: *Candida tropicalis* IHMT 388/98.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Caracterização Morfológica

Todas as estirpes de *C. neoformans* seleccionadas foram estudadas no que diz respeito à morfologia macroscópica das colónias obtidas em meio sólido e à morfologia microscópica das células. Quando cultivadas em meio de Sabouraud, a maioria das estirpes desenvolveram colónias opacas, planas, de margem lisa e secas, pastosas ou mucosas. À excepção das estirpes CN 43, CN 55 e CN 123 que desenvolveram colónias pastosas e das estirpes CN 23, CN 24, CN 54, CN 112, PYCC 3533, PYCC 3534, PYCC 5025, PYCC 5026, PYCC 5027 e PYCC 5028 que produziram colónias mucosas e brilhantes que escorrem no meio de cultura ao fim de poucos dias, todas as outras estirpes desenvolveram colónias secas. O grau de mucosidade das colónias foi a característica macromorfológica mais variável observada entre os isolados (Fig. 2.2), embora esta fosse também influenciada pela constituição do meio de cultura. Quando cultivados em meio de Sabouraud, os isolados mais mucosos produziram menos muco. A sua produção aumentava em meios contendo extracto de malte, como o meio MYP ou o meio YM.

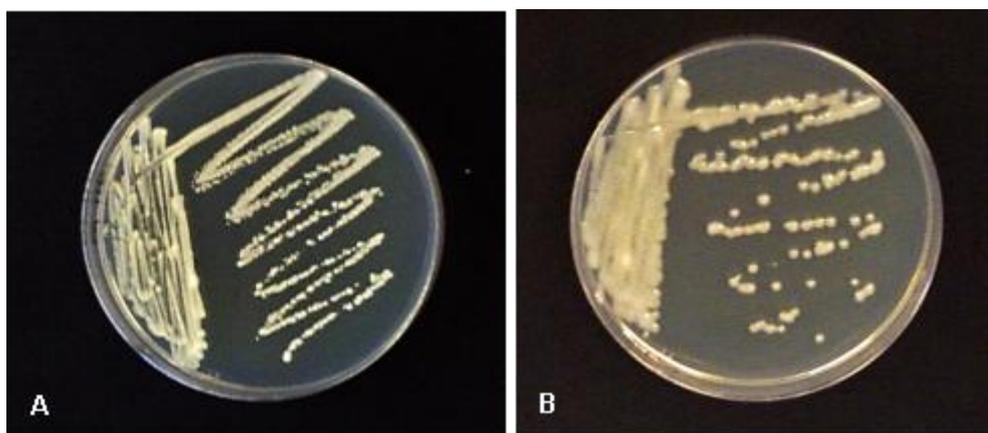


Fig. 2.2 - Aspecto de culturas de *Cryptococcus neoformans* em meio de Sabouraud: (A) colónias secas de *C. neoformans* CN 38; (B) colónias mucosas de *C. neoformans* PYCC 3533.

Sempre que se tornou necessário minimizar a produção de polissacáridos, as estirpes mais mucosas foram cultivadas em meio de Sabouraud modificado (16% p/v glucose, 2,9% NaCl, pH 4,2) e incubadas a uma temperatura mais baixa (15°C).

A cor das colónias inicialmente era branca, mas ao fim de algumas semanas, e para algumas estirpes, podia ficar cor de camurça mais ou menos escura.

Na observação ao microscópio, as células de todos os isolados apareceram como redondas ou ligeiramente ovais, com gemulação simples e dimensões a variar entre os 6 e os 12 µm (valor médio, 9 µm). Somente a estirpe CN 2 mostrou ter também algumas células ovais mais alongadas. As preparações com Tinta da China permitiram observar que as células de todas as estirpes produzem cápsula, embora as dimensões fossem muito variáveis. As cápsulas de maiores dimensões correspondiam a uma maior produção de muco. Nos exames directos de amostras biológicas (Fig. 2.3) observou-se que a cápsula é significativamente maior *in vivo* do que *in vitro*, para uma mesma estirpe. No entanto, nos produtos provenientes de doentes com SIDA sob terapêutica antifúngica foi frequente a observação de cápsulas menores, por vezes com dimensões muito reduzidas.

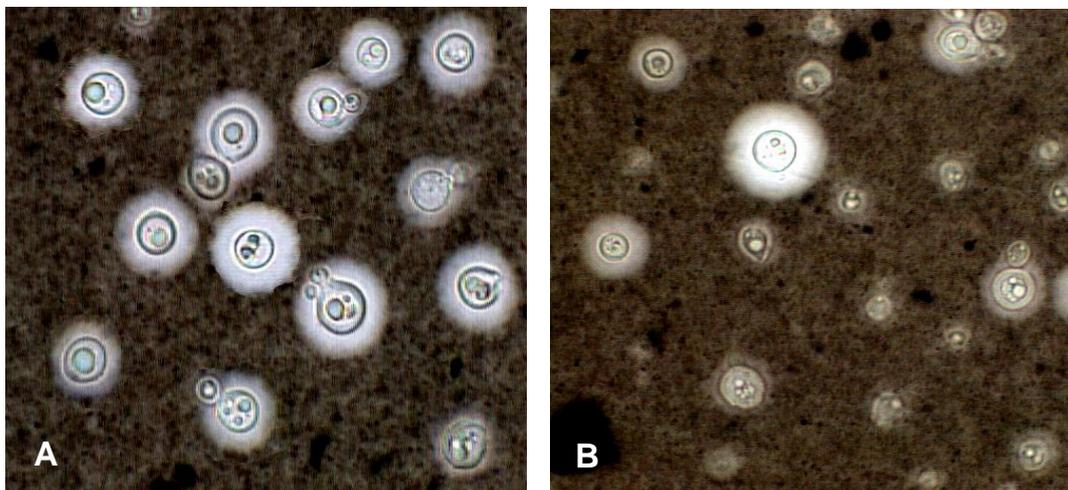


Fig. 2.3 - Células de *Cryptococcus neoformans* contrastadas com Tinta da China para observação da cápsula extracelular. (A) Exame directo de líquido cefalorraquidiano (LCR); (B) Exame directo de biópsia de pele. Ampliação: 1500x.

Nas placas de Dalmau, com meio CMA, nenhum dos isolados estudados desenvolveu pseudomicélio ou micélio.

2.3.2. Caracterização Fisiológica

Testes convencionais

Foram estudados os perfis de assimilação de todas as estirpes isoladas de infecções em relação a um conjunto de 31 compostos, utilizando o *kit* de identificação ID 32 C[®] (BioMérieux) comercialmente disponível. Este procedimento faz parte do protocolo habitual do Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UNL) para a identificação de todas leveduras isoladas a partir de produtos biológicos. Apesar da eficácia destes testes se revelar frequentemente limitada e o número de testes reduzido, este é o método de identificação de leveduras mais utilizado nos laboratórios de microbiologia clínica por ser de fácil aquisição e exequibilidade e não requerer profundos conhecimentos técnicos nem equipamentos sofisticados.

Posteriormente, e para avaliar a uniformidade dos resultados obtidos com as estirpes de referência das duas variedades de *C. neoformans*, foram determinados os perfis de assimilação das estirpes cedidas pela PYCC com o mesmo *kit* de identificação. Os resultados obtidos para todas as estirpes de *C. neoformans* incluídas neste estudo são apresentados na Tabela 2.4.

Em resumo, todos os isolados de *C. neoformans* estudados assimilaram:

glucose	metil- α -D-glucósido	gluconato
galactose	manitol	glucuronato
ramnose	sorbitol	palatinose
sacarose	inositol	esculina
maltose	2-ceto-gluconato	

Nenhuma das estirpes cresceu na presença de:

melibiose	D,L-lactato
lactose	ciclo-heximida
glicerol	levulinato

Em relação aos 51 isolados estudados, somente uma estirpe não cresceu na presença de D-xilose (PYCC 5025), ribose (CN 118), melezitose (CN 109) ou N-acetil-glucosamina (CN 119). Relativamente aos restantes oito compostos ensaiados, os resultados foram muito variáveis. Com base nos resultados obtidos e recorrendo à base de dados ID 32 C fornecida pelo fabricante do *kit*, todas as estirpes foram identificadas como sendo *C. neoformans*.

Tabela 2.4 – Perfis de presença/ausência de crescimento das estirpes de *Cryptococcus neoformans* estudadas utilizando o *kit* ID 32 C® (BioMérieux).

Estirpes *	Glucose	Galactose	Sorbose	Glucosamina	Ribose	D-Xilose	L-Arabinose	Ramnose	Sacarose	Maltose	Trealose	Metil- α -D-glucósido	Celbiose	Melibiose	Lactose	Rafinose	Melezitose	Glicerol	Eritritol	Manitol	Sorbitol	Inositol	2-Ceto-gluconato	Gluconato	Glucuronato	D,L-Lactato	Ciclo-heximida	N-Acetil-glucosamina	Palatinose	Levulinato	Esculina	
CN 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
CN 4	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 15	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 23	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 24	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 27	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 32 ¹	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 50 ¹	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 59 ¹	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 70 ¹	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 71 ¹	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 74 ¹	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 83 ¹	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 92 ¹	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 34	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 38 ²	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 40 ²	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 48	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 49 ³	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 52 ³	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 54	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 55	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 57	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 65	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 68 ⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 77 ⁴	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 87 ⁵	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 88 ⁵	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 95	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 100	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 107	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 109	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 112	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 118	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 119	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
CN 123	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<u>PYCC 3528</u>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
PYCC 3529	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
PYCC 3530	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<u>PYCC 3533</u>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
PYCC 3534	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
PYCC 3957 ^T	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
PYCC 4208	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
PYCC 5025	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<u>PYCC 5026</u>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<u>PYCC 5027</u>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
<u>PYCC 5028</u>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+

T, estirpe-tipo; PYCC, *Portuguese Yeast Culture Collection*, Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, Portugal.

* Os números em expoente referem-se a estirpes isoladas do mesmo doente.

Temperatura máxima de crescimento

Foi determinada a temperatura máxima de crescimento (T_{max}) de todos os isolados de *C. neoformans* em meio líquido YM. Na Tabela 2.5 são apresentados os resultados obtidos.

O valor da T_{max} dos isolados de *C. neoformans* variou entre os 30°C e os 39°C. Cerca de 80% das estirpes cresceu a temperaturas iguais ou superiores a 37°C (Fig. 2.4). 18% das estirpes isoladas de infecções criptocócicas revelaram uma T_{max} inferior a 37°C, o que devia ter impedido a proliferação no interior do organismo hospedeiro. No entanto, as condições aí são diferentes das ensaiadas e a temperatura máxima poderá aumentar. Por outro lado, apenas num dos casos (CN 2) temos indicações de que a infecção estava disseminada. Bemis *et al.* (2000) isolaram igualmente uma estirpe patogénica de uma lesão granulomatosa de um felino que, *in vitro*, crescia muito lentamente a 35°C e não crescia à temperatura de 37°C. Todavia, no hospedeiro, a mesma estirpe proliferou e invadiu os tecidos do hospedeiro conforme ficou comprovado por imagens histológicas.

Os isolados obtidos a partir de amostras de pele apresentaram uma T_{max} média de 35°C, temperatura ligeiramente inferior à da maioria das estirpes isoladas a partir do LCR e do sangue, zonas menos superficiais do organismo. Apesar do trajecto do fungo estar, provavelmente, relacionado com a via respiratória e evidenciar um claro neurotropismo, a proliferação na pele, que tem uma temperatura inferior à do interior do organismo, pode eventualmente estar relacionada com estirpes de T_{max} mais baixa.

As estirpes isoladas a partir de um mesmo doente, quer na mesma fase da infecção a partir de produtos biológicos diferentes, quer em alturas diferentes da progressão da infecção, revelaram T_{max} idênticas, sugerindo que os diferentes isolados representam a mesma estirpe.

A maior parte dos isolados provenientes de outras origens mostraram igualmente uma T_{max} compatível com uma eventual proliferação no interior do organismo de potenciais hospedeiros, o que sugere a capacidade dessas estirpes poderem sobreviver em condições de parasitismo. A T_{max} dos isolados ambientais variou entre 34 e 39°C com uma T_{max} média de 37°C.

Tabela 2.5 – Crescimento a diferentes temperaturas das estirpes de *Cryptococcus neoformans* estudadas.

Estirpes *	Temperatura (°C)												
	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
CN 2	++	++	+	+W	+W	+W	+W	+W	+W	-	-	-	-
CN 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+W	-
CN 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-
CN 23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
CN 24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W	-
CN 27	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+W	+W
CN 32 ¹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W
CN 50 ¹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+W
CN 59 ¹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+W
CN 70 ¹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+W	+W
CN 71 ¹	+++	++	++	+	+W	+W	-	-	-	-	-	-	-
CN 74 ¹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W	+W
CN 83 ¹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+W
CN 92 ¹	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W
CN 34	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
CN 38 ²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W	+W	-
CN 40 ²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W	-	-
CN 43	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	-
CN 48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	+W	+W	-	-
CN 49 ³	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W	-
CN 52 ³	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W	-
CN 54	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	-
CN 55	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W
CN 57	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+W
CN 65	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	-
CN 68 ⁴	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	-	-
CN 77 ⁴	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	-	-
CN 73	+++	+++	++	++	++	+	+W	+W	+W	+W	+W	-	-
CN 79	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W	-	-
CN 80	+++	+++	+++	++	++	+	+W	+W	+W	+W	-	-	-
CN 87 ⁵	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+W	+W
CN 88 ⁵	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+W	+W
CN 95	+++	+++	++	++	+	+	+	+W	+W	+W	-	-	-
CN 100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+W
CN 107	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+W	-
CN 109	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+W	+W	+W	-
CN 112	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
CN 118	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W	+W	+W
CN 119	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+W
CN 123	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+W
PYCC 3528	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W
PYCC 3529	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	+W	-	-
PYCC 3530	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	-	-	-
PYCC 3533	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	-
PYCC 3534	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
PYCC 3957 ^T	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+W
PYCC 4208	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
PYCC 5025	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+W	-	-
PYCC 5026	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+W	-
PYCC 5027	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+W	+W	-	-	-
PYCC 5028	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+W	-	-

T, estirpe-tipo; Registo do crescimento: ver texto (2.2.4).

* os números em expoente referem-se a estirpes isoladas do mesmo doente.

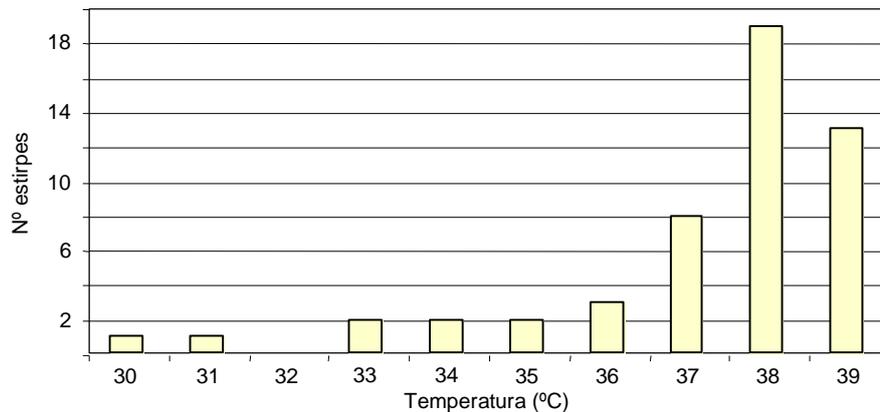


Fig. 2.4 - Distribuição da temperatura máxima de crescimento dos isolados de *Cryptococcus neoformans* estudados.

Estes resultados concordam, na essência, com os de Littman e Borok (1968) e de uma série de outros grupos que demonstraram que o crescimento a 37°C é uma característica importante na identificação desta espécie. Aliás, é conhecido que a temperatura máxima de crescimento varia relativamente pouco entre estirpes de uma mesma espécie (Rodrigues de Sousa *et al.* 1995, Van Uden 1984). É, portanto, possível que os isolados que exibiram valores de T_{max} mais baixos (30-35°C) tenham sido incorrectamente identificados.

Apesar de *C. neoformans* tolerar bem a temperatura do interior do organismo dos mamíferos é, no entanto, entre 25°C e 30°C que se observa a taxa de crescimento mais elevada (Howard 1961, Madeira-Lopes & Van Uden 1982), conforme também pudemos constatar.

Num trabalho interessante realizado por Mosberg e Alvarez-Dechoudens (1951), foi estudado o efeito simultâneo da temperatura e do pH no crescimento de *C. neoformans*. Observaram que, a um pH próximo da neutralidade e à temperatura de 40°C, as células só morriam ao fim de 3 dias e que, por este facto, a febre não deveria ser usada como terapêutica na criptococose. Resta saber se estes resultados não se alterariam quando em presença de drogas ministradas na terapêutica da criptococose (Madeira Lopes 1986). Aqueles autores observaram também que em meios mais ácidos a resistência das células à morte a 40°C era superior, facto que poderia justificar a tolerância de *C. neoformans* às condições ambientais do aparelho digestivo das aves.

Teste CGB

O teste CGB em meio sólido com L-canavanina, glicina e azul de bromotimol tem sido utilizado para diferenciar as duas variedades de *C. neoformans*. Este teste foi realizado para todas as estirpes em estudo e observou-se que os isolados identificados como *C. neoformans* var. *neoformans*, por não assimilarem a glicina e serem sensíveis à L-canavanina, não foram capazes de crescer ao fim de 5 dias de incubação (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 – Resultados do teste CGB, que aprecia a utilização de glicina na presença de L-canavanina, aplicado às estirpes de *Cryptococcus neoformans* estudadas.

Registo de crescimento: ver texto (2.2.4).

Estirpe *	Leitura		Estirpe *	Leitura	
	72 h	5 d		72 h	5 d
CN 2	-	-	CN 77 ⁴	-	-
CN 4	-	-	CN 73	-	-
CN 15	+++	+++	CN 79	+	++
CN 23	-	-	CN 80	+	++
CN 24	-	-	CN 87 ⁵	-	-
CN 27	-	-	CN 88 ⁵	-	-
CN 32 ¹	-	-	CN 95	-	-
CN 50 ¹	-	-	CN 100	-	-
CN 59 ¹	-	-	CN 107	-	-
CN 70 ¹	-	-	CN 109	-	-
CN 71 ¹	+	+	CN 112	-	-
CN 74 ¹	-	-	CN 118	-	-
CN 83 ¹	-	-	CN 119	+W	+
CN 92 ¹	-	-	CN 123	-	-
CN 34	-	-	PYCC 3528	+W	+
CN 38 ²	-	-	PYCC 3529	-	-
CN 40 ²	-	-	PYCC 3530	+W	+
CN 43	-	-	PYCC 3533	+	+
CN 48	-	-	PYCC 3534	-	-
CN 49 ³	-	-	PYCC 3957 ^T	-	-
CN 52 ³	-	-	PYCC 4208	+W	+W
CN 54	-	-	PYCC 5025	+++	+++
CN 55	-	-	PYCC 5026	+++	+++
CN 57	-	-	PYCC 5027	+++	+++
CN 65	-	-	PYCC 5028	+++	+++
CN 68 ⁴	-	-			

* Os números em expoente referem-se a estirpes isoladas do mesmo doente.

O meio permaneceu, portanto, com a cor amarela inicial. Pelo contrário, os isolados de *C. neoformans* var. *gattii* utilizaram a glicina na presença de L-canavanina, fazendo virar a cor do indicador para azul (Fig. 2.5). À excepção das estirpes PYCC 5025, PYCC 5026, PYCC 5027 e PYCC 5028 que cresceram nitidamente neste meio, fazendo virar a cor do indicador para um azul forte ao fim de 48-72 horas, nenhuma outra estirpe o fez tão exuberantemente. Todavia, alguns isolados (CN 79, CN 80, CN 119, PYCC 3528,

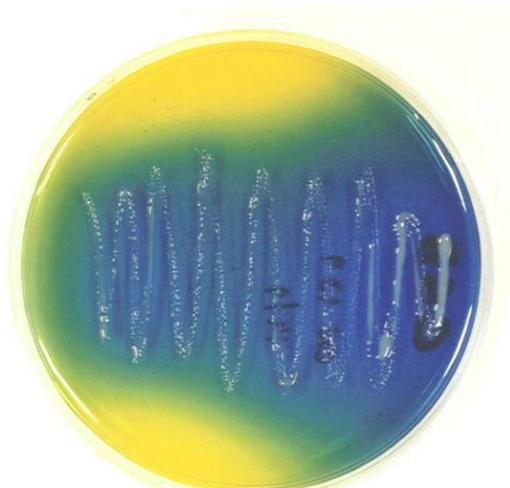


Fig. 2.5 - Aspecto de uma placa com o meio de CGB após crescimento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* PYCC 5025.

PYCC 3530, PYCC 3533, PYCC 4208) revelaram, ao fim de 3-4 dias, um crescimento ligeiro que provocou a mudança de cor do meio de cultura. No caso dos isolados CN 79 e CN 80 o meio de cultura ficou ao fim de 5 dias totalmente azul esverdeado.

Com as estirpes CN 15 e CN 71, que mais tarde vieram a ser identificadas como espécies diferentes de *C. neoformans*, observou-se também a mudança de cor do indicador do meio. É de referir, assim, que este meio de cultura só deverá ser utilizado em combinação com outros métodos que permitam identificar *C. neoformans*. Caso contrário poderá induzir a conclusões erradas. Os resultados dos testes fisiológicos em combinação com os do teste CGB pareciam sugerir que o isolado CN 15 correspondia a uma estirpe de *C. neoformans* var. *gattii*.

Vale a pena recordar, no entanto, que o teste CGB é, mesmo assim, mais fiável (Swinne 1984) do que outros métodos usados para o mesmo efeito: meio de azul de bromotimol-creatinina-dextrose, meio de vermelho de fenol-glicina-ciclo-heximida (Kwon-Chung *et al.* 1982b) ou o meio de glicina-ciclo-heximida (Salkin & Hurd 1982).

Kwon-Chung *et al.* (1982b) referem que, para evitar falsos positivos com o aparecimento de colónias de *C. neoformans* var. *neoformans* no meio CGB, é necessário que o inóculo da levedura no meio selectivo seja muito fraco. Neste trabalho foi tomada essa precaução, o que nos deixou particularmente curiosos em relação à caracterização molecular de algumas estirpes (CN 79, CN 80, CN 119, PYCC 3528, PYCC 3530, PYCC 3533, PYCC 4208)

fenotipicamente identificadas como pertencendo à variedade *neoformans*, mas que deram resultados positivos. No caso de CN 79 e CN 80 verificou-se crescimento significativo no meio de CGB e a coloração observada era algo ambígua. Nakamura *et al.* (1998) detectaram igualmente estirpes de *C. neoformans* var. *neoformans* dos serotipos A e D capazes de crescer neste meio. Referem que para 27 dos isolados analisados a interpretação dos resultados era subjectiva.

2.3.3. Caracterização Bioquímica

Determinação dos serotipos

Os resultados obtidos nos testes de aglutinação com o *kit* comercial Crypto-Check[®], latron-Tokyo (Ikeda *et al.* 1982), para as diferentes estirpes de *C. neoformans* estudadas são apresentados na Tabela 2.7 e ilustrados na Fig. 2.6.

Tabela 2.7 – Serotipos das estirpes de *Cryptococcus neoformans* estudadas.

Estirpe *	Factores séricos aglutinados	Serotipos	Estirpe *	Factores séricos aglutinados	Serotipos
CN 2	1 e 7	A	CN 73	1, 7 e 8	AD
CN 4	1 e 7	A	CN 79	1 e 8	D
CN 23	1 e 7	A	CN 80	1 e 8	D
CN 24	1 e 7	A	CN 87 ⁵	1 e 7	A
CN 27	1 e 7	A	CN 88 ⁵	1 e 7	A
CN 32 ¹	1 e 7	A	CN 95	1 e 7	A
CN 50 ¹	1 e 7	A	CN 100	1 e 7	A
CN 59 ¹	1 e 7	A	CN 107	1, 7 e 8	AD
CN 70 ¹	1 e 7	A	CN 109	1 e 8	D
CN 74 ¹	1 e 7	A	CN 112	1 e 7	A
CN 83 ¹	1 e 7	A	CN 118	1 e 7	A
CN 92 ¹	1 e 7	A	CN 119	1 e 7	A
CN 34	1 e 7	A	CN 123	1 e 7	A
CN 38 ²	1, 7 e 8	AD	PYCC 3528	1 e 8	D
CN 40 ²	1, 7 e 8	AD	PYCC 3529	1 e 7	A
CN 43	1 e 7	A	PYCC 3530	1 e 7	A
CN 48	1 e 8	D	PYCC 3533	1 e 7	A
CN 49 ³	1, 7 e 8	AD	PYCC 3534	1 e 7	A
CN 52 ³	1, 7 e 8	AD	PYCC 3957 ^T	1 e 8	D
CN 54	1 e 7	A	PYCC 4208	1, 7 e 8	AD
CN 55	1 e 7	A	PYCC 5025	1 e 5	B
CN 57	1 e 7	A	PYCC 5026	1 e 5	B
CN 65	1 e 7	A	PYCC 5027	1 e 5	B
CN 68 ⁴	1 e 8	D	PYCC 5028	1 e 5	B
CN 77 ⁴	1 e 8	D			

* Os números em expoente referem-se a estirpes isoladas do mesmo doente.

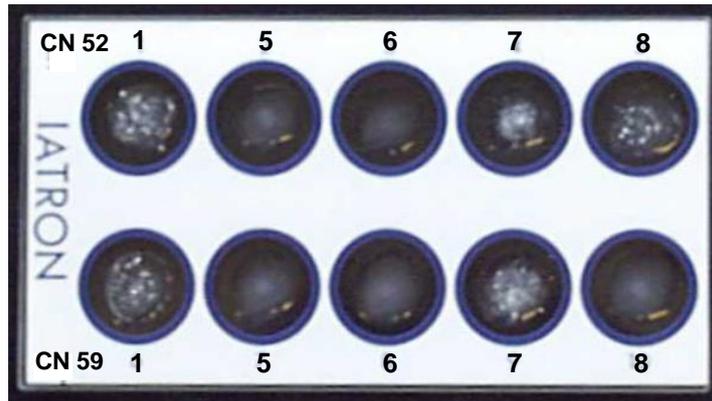


Fig. 2.6 - Ilustração dos resultados obtidos nos testes de aglutinação com os factores antigénicos 1, 5, 6, 7 e 8 para determinação dos serotipos das estirpes de *Cryptococcus neoformans*, segundo o método de Ikeda *et al.* (1982). Estão representadas duas estirpes: CN 52 (superior) e CN 59 (inferior). Para explicação dos factores antigénicos em cada poço ver Tabela 2.1.

Relativamente aos isolados fenotipicamente identificados como *C. neoformans* var. *neoformans*, 61,2% dos isolados estudados são do serotipo A (aglutinação com os factores 1 e 7), 16,3% do serotipo D (aglutinação com os factores 1 e 8) e 14,3% do serotipo AD (aglutinação com os factores 1, 7 e 8). Os quatro isolados classificados como variedade *gattii* são do serotipo B (aglutinação com os factores 1 e 5). Não foi encontrado nenhum isolado do serotipo C.

Não se realizou a determinação do serotipo para os isolados CN 15 e CN 71 porque já se tinha, entretanto, confirmado que tinham sido identificados incorrectamente e não pertenciam à espécie *C. neoformans*.

Os resultados obtidos estão de acordo com os relatados por outros autores. A maioria das infecções criptocócicas em doentes afectados por SIDA é provocada pelo serotipo A (Rinaldi *et al.* 1986, Steenbergen & Casadevall 2000). Este serotipo tem uma distribuição ampla e é o mais frequentemente isolado a partir de excrementos de pombo. Na Europa, pelo contrário, existe uma frequência mais elevada de estirpes do serotipo D e AD quando os valores são comparados aos das outras regiões do Globo (Baró *et al.* 1998, Dromer *et al.* 1996a, *idem* 1996b, Kwon-Chung & Bennett 1984a). Como apenas 16% das estirpes clínicas de *C. neoformans* incluídas neste trabalho são do serotipo D, os valores encontrados na nossa amostra são inferiores aos observados em outros países europeus: 71% e 49% na Itália, 34% na Bélgica, 32% na Suíça e 20% em França (Tortorano *et al.* 1997). Em relação aos isolados clínicos do serotipo AD, os nossos valores (16%) são semelhantes aos

encontrados nos outros países da Europa e superiores aos encontrados em vários países do continente americano (Kwon-Chung & Bennett 1984a).

Tortorano *et al.* (1997) observaram que as lesões cutâneas eram unicamente provocadas por estirpes do serotipo D e que ocorriam em 12,6% dos doentes VIH+ e em 58,3% dos doentes VIH- infectados por este serotipo. Nas quatro estirpes por nós estudadas e isoladas de amostras da pele (CN 48, CN 68, CN 77 e CN 73), três são do serotipo D e uma do serotipo AD. Estes quatro isolados constituem 2/3 dos isolados clínicos do serotipo D.

As estirpes do serotipo B estão associadas a *Eucalyptus camaldulensis* (Ellis & Pfeiffer 1990b) e *E. tereticornis* (Licea *et al.* 1996). Os isolados clínicos de serotipo B e C são mais frequentemente obtidos a partir de doentes não infectados pelo VIH (Rozenbaum *et al.* 1990, Speed *et al.* 1993) em regiões tropicais e subtropicais do Globo (Currie *et al.* 1990, Ellis 1987, Gezuele *et al.* 1993, Kwon-Chung & Bennett 1984a). O serotipo B é mais frequente do que o serotipo C, sendo este último somente prevalente no Sul da Califórnia (Kwon-Chung & Bennett 1984a). Os isolados do serotipo B incluídos neste estudo vieram da Austrália e foram isolados a partir de amostras ambientais.

Produção de pigmento

Como foi referido, a formação de pigmentos do tipo melanina a partir de diferentes compostos fenólicos pode ser usada para uma diferenciação presumptiva rápida de *C. neoformans* em relação a outras leveduras patogénicas (Chaskes & Tyndall 1975, Edberg *et al.* 1980).

Neste trabalho estudou-se a capacidade de produção de pigmento em todas as estirpes seleccionadas utilizando dois meios de cultura sólidos: meio com extracto de sementes de Niger (Staib 1962) e meio com D,L-DOPA (Polacheck & Kwon-Chung 1988). Com o primeiro meio a incubação foi feita à temperatura ambiente. Os isolados começaram a produzir pigmento (Fig. 2.7 A) ao fim de 7 a 10 dias, atingindo o máximo de produção ao fim de 2 semanas. Com o meio de D,L-DOPA a incubação foi feita a duas temperaturas, 25°C e 37°C. A produção de pigmento começou a ser visível (Fig. 2.7 B), em média, ao fim de 1-2 dias, embora alguns isolados necessitassem de mais tempo para produzir um resultado semelhante. Com o meio de D,L-DOPA foi também registada a

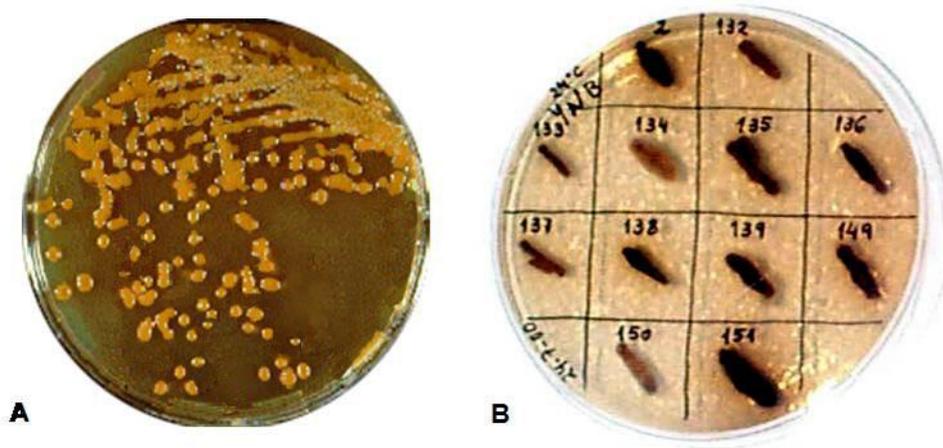


Fig. 2.7 - Produção de pigmento tipo-melanina por *Cryptococcus neoformans*: (A) meio contendo extracto de sementes de Niger. Inóculo constituído por uma mistura de *C. neoformans* e *Candida albicans*; (B) meio contendo D,L-DOPA. Pode observar-se, para algumas estirpes, a difusão de pigmento para o meio de cultura.

difusão de pigmento para o meio de cultura. O resultado das observações está registado na Tabela 2.8.

Staib *et al.* (1987) referiram que a produção de pigmento escuro por *C. neoformans* em meio com sementes de Niger e 0,1% de glucose ocorria ao fim de 2 a 5 dias de incubação, a 26°C, e que concentrações elevadas de glucose atrasavam a síntese de pigmento. Como no meio de cultura utilizámos uma concentração de 1% de glucose é provável que este factor tenha originado uma produção mais lenta.

Todos os isolados de *C. neoformans* estudados produziram nitidamente pigmento em qualquer dos dois meios de cultura ensaiados, à excepção dos isolados CN 15 e CN 71 (Tabela 2.8). A produção de pigmento foi mais intensa à temperatura de 37°C. A difusão de pigmento para o meio de cultura variou com a estirpe.

Embora alguns trabalhos refiram que a actividade da enzima fenol-oxidase é mais intensa a 25-30°C do que a 37°C (Jacobson & Emery 1991a, Nurudeen & Ahearn 1979), outros autores referem actividade máxima entre 37°C e 40°C (Paliwal & Randhawa 1978). Shaw e Kapica (1972) observaram também que entre 40 e 45°C, a pH 6,8, era atingida a taxa máxima de oxidação de D,L-DOPA por acção da fenol-oxidase. Kwon-Chung e Rhodes (1996) verificaram que, apesar da enzima ter uma actividade maior a 37°C, a taxa

Tabela 2.8 – Produção de pigmento do tipo melanina por *Cryptococcus neoformans* em meios contendo sementes de Niger ou D,L-DOPA.

Estirpe*	Sementes de Niger	D,L-DOPA** (37°C)	Estirpe*	Sementes de Niger	D,L-DOPA** (37°C)
CN 2	+	+ (++)	CN 77 ⁴	+	+ (-)
CN 4	+	+ (+++)	CN 73	+	+ (++)
CN 15	±	± (-)	CN 79	+	+ (-)
CN 23	+	+ (++)	CN 80	+	+ (-)
CN 24	+	+ (+++)	CN 87 ⁵	+	+ (++)
CN 27	+	+ (±)	CN 88 ⁵	+	+ (+++)
CN 32 ¹	+	+ (+++)	CN 95	+	+ (+++)
CN 50 ¹	+	+ (+++)	CN 100	+	+ (++)
CN 59 ¹	+	+ (++)	CN 107	+	+ (+++)
CN 70 ¹	+	+ (++)	CN 109	+	+ (++)
CN 71 ¹	-	-	CN 112	+	+ (++)
CN 74 ¹	+	+ (++)	CN 118	+	+ (+++)
CN 83 ¹	+	+ (+++)	CN 119	+	+ (++)
CN 92 ¹	+	+ (++)	CN 123	+	+ (+++)
CN 34	+	+ (±)	PYCC 3528	+	+ (+)
CN 38 ²	+	+ (+)	PYCC 3529	+	+ (+++)
CN 40 ²	+	+ (±)	PYCC 3530	+	+ (+)
CN 43	+	+ (-)	PYCC 3533	+	+ (++)
CN 48	+	+ (±)	PYCC 3534	+	+ (++)
CN 49 ³	+	+ (-)	PYCC 3957 ^T	+	+ (+++)
CN 52 ³	+	+ (±)	PYCC 4208	+	+ (+++)
CN 54	+	+ (+++)	PYCC 5025	+	+ (++)
CN 55	+	+ (±)	PYCC 5026	+	+ (++)
CN 57	+	+ (++)	PYCC 5027	+	+ (++)
CN 65	+	+ (±)	PYCC 5028	+	+ (+++)
CN 68 ⁴	+	+ (-)			

* os números em expoente referem-se a estirpes isoladas do mesmo doente.

** entre parêntesis está indicada, de forma semi-quantitativa, a presença/ausência de difusão de pigmento para o meio de cultura.

de consumo do substrato era menor, o que resultava num aumento do tempo necessário para a produção de pigmento. Inversamente, a 30°C, observaram que era mais rápida a produção de melanina devido a um consumo mais eficiente de D,L-DOPA. Não há, portanto, uma correlação total entre a actividade da enzima e a intensidade do pigmento produzido. Em concordância com estes resultados, observámos igualmente que, de forma geral, a produção de pigmento era mais rápida a 25°C (24 a 36 horas) mas, com mais tempo de incubação, havia uma produção mais intensa de pigmento (colónias mais escuras) à temperatura de 37°C (6-10 dias). Rosas e Casadevall (1997) observaram também que a produção de melanina por *C. neoformans* em meio mínimo contendo D,L-DOPA tinha início entre o 2º e 3º dias de incubação e atingia o máximo no 8º dia.

Polak (1989) desenvolveu um trabalho interessante sobre a função da melanina na patogénese de *C. neoformans* no cérebro, baço e fígado. Utilizaram dois tipos de estirpes, um

tipo selvagem produtor de melanina (*Mel+*) e o outro tipo *Mel-*. Um dia depois de uma injeção intravenosa com células de *C. neoformans* dos dois tipos (*Mel+* e *Mel-*) em ratinhos verificaram, nos dois grupos, um número elevado de células da levedura no baço e no fígado e um número reduzido no cérebro. Ao fim de uma semana de infecção o número de células *Mel+* do cérebro tinha aumentado 10^7 a 10^8 vezes, enquanto que no fígado e baço o número se mantinha. Relativamente às estirpes *Mel-*, observaram que as células tinham sido completamente eliminadas do cérebro, parcialmente do baço e em menor quantidade do fígado. Este trabalho sugere que o sistema de defesa do hospedeiro remove eficientemente os mutantes negativos para a melanina, mas não interfere com a proliferação das estirpes produtoras de melanina, principalmente no tecido cerebral.

Nosanchuk *et al.* (1999) mostraram que *C. neoformans* produz melanina tanto *in vitro*, em infecções murinas experimentais, como no tecido cerebral humano. Estes autores colocaram a hipótese de que a dificuldade em eliminar este microrganismo com anfotericina B pode ser consequência da acção da melanina, a qual poderá conferir uma maior resistência de *C. neoformans* à acção deste antifúngico sistémico. Assim, a enzima fenol-oxidase e o seu produto, a melanina, parecem desempenhar papéis múltiplos na sobrevivência do organismo tanto no ambiente como em hospedeiros susceptíveis.

Produção de urease

À excepção da estirpe CN 15, todos os isolados produziram um resultado positivo para o teste da urease (Fig. 2.8). A viragem do indicador (de amarelo para carmim) foi muito rápida (desde 5 minutos a 3 horas), pois foi utilizado um inóculo forte.

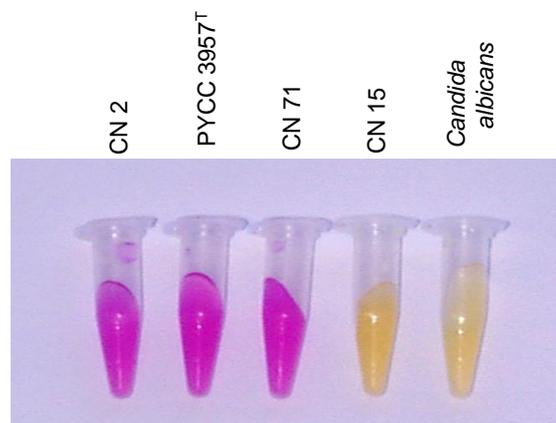


Fig. 2.8 - Produção de urease por *Cryptococcus neoformans* em meio de Christensen.

A estirpe CN 15 originou um resultado negativo o que sugeria tratar-se de uma levedura ascomiceta e apontava, novamente, para uma identificação incorrecta.

Apesar de terem sido documentados casos raros de infecções criptocócicas por estirpes urease-negativas (Bava *et al.* 1993, Ruane *et al.* 1988), não era de excluir que se estivesse perante isolados mal identificados.

Actividade proteolítica

O principal papel das enzimas extracelulares produzidas pelos fungos patogénicos consiste na degradação de compostos presentes nos tecidos do hospedeiro para obtenção de nutrientes (Muhsin *et al.* 1997). Neste trabalho apreciou-se a produção de enzimas proteolíticas em agar suplementado com diferentes substratos proteicos. O estudo incluiu a hidrólise da caseína, a liquefacção da gelatina e a produção de proteases aspárticas (SAPs). Na Tabela 2.9 estão representados os resultados obtidos com todas as estirpes de *C. neoformans* nos diferentes substratos proteicos.

Relativamente a uma actividade proteolítica global foram testados três substratos: caseína pura, leite desnatado e azocaseína. Os resultados obtidos com os dois primeiros (Fig. 2.9) foram muito semelhantes entre si e em relação às duas temperaturas ensaiadas (24°C e 37°C). O teste com a azocaseína foi menos sensível. Considerando os resultados com caseína (ou leite desnatado), 94% das estirpes produziu enzimas proteolíticas, tendo a actividade sido ligeiramente mais intensa a 25°C. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Chen *et al.* (1997a) que detectaram em *C. neoformans* a síntese de um número mais variado de enzimas a 30°C do que a 37°C, apesar dos perfis proteicos serem semelhantes nos dois casos.

Dos quatro isolados de *C. neoformans* var. *gattii*, três não degradaram a caseína em qualquer das temperaturas. Estes resultados contrariam os obtidos por Aoki *et al.* (1994) que observaram que a produção de proteases pelos serotipos B e C era mais intensa do que a dos serotipos A, D e AD.

O tempo necessário para detectar a actividade proteolítica de *C. neoformans* em meio de caseína foi mais longo (três a quatro semanas) do que o descrito como acontecendo para outras leveduras: três dias para *C. albicans* (Staib 1965, Vazquez-

Tabela 2.9 – Actividade proteolítica de *Cryptococcus neoformans* testada com diferentes substratos.

Estirpes *	Actividade proteolítica **				
	Caseína	Leite Desnatado	Azocaseína	Gelatina	SAP
CN 2	++	+	±	+++	+
CN 4	+++	+++	++	+++	++
CN 23	+++	+++	++	+++	++
CN 24	+++	+++	+	+++	++
CN 27	++	++	+	+++	±
CN 32 ¹	++	++	±	+++	+
CN 50 ¹	++	++	+	+++	+
CN 59 ¹	++	++	+	+++	+
CN 70 ¹	+	+	-	+++	+
CN 74 ¹	++	++	±	+++	+
CN 83 ¹	++	++	±	+++	+
CN 92 ¹	++	++	+	+++	+
CN 34	+++	+++	++	+++	+
CN 38 ²	+++	+++	+	+++	±
CN 40 ²	+++	+++	+	+++	±
CN 43	+	+	±	+++	±
CN 48	+++	+++	+	+++	±
CN 49 ³	+++	+++	+	+++	±
CN 52 ³	+++	+++	+	+++	±
CN 54	+++	+++	+	+++	±
CN 55	+++	+++	++	+++	±
CN 57	+++	+++	++	+++	+
CN 65	+	+	+	+++	±
CN 68 ⁴	+	+	±	+++	+
CN 77 ⁴	+	-	-	+++	±
CN 73	+++	+++	++	+++	±
CN 79	+++	+++	++	+++	+
CN 80	++	++	+	+++	+
CN 87 ⁵	++	+	±	+++	±
CN 88 ⁵	++	+	±	+++	±
CN 95	++	±	±	+++	+
CN 100	+++	+++	++	+++	±
CN 107	++	±	±	+++	±
CN 109	++	-	-	+++	++
CN 112	+	++	+	+++	±
CN 118	+	+	±	+++	±
CN 119	+++	+++	±	+++	±
CN 123	+++	+++	+	+++	+
PYCC 3528	±	±	±	+++	+
PYCC 3529	++	++	+	+++	±
PYCC 3530	-	+	++	+++	+
PYCC 3533	-	+	++	+++	+
PYCC 3534	-	+	++	+++	+
PYCC 3957 [†]	+++	+++	++	+++	±
PYCC 4208	+++	+++	++	+++	±
PYCC 5025	-	-	-	+++	+
PYCC 5026	-	-	-	+++	+
PYCC 5027	-	-	-	+++	+
PYCC 5028	++	+	-	+++	+

* os números em expoente referem-se a estirpes isoladas do mesmo doente.

** resultados obtidos a 37°C (caseína, leite desnatado e azocaseína) ou 25°C (gelatina e SAP - proteases aspárticas).

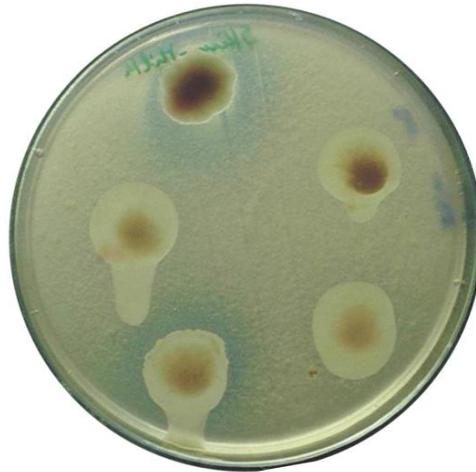


Fig. 2.9 - Actividade proteolítica de *Cryptococcus neoformans* em leite desnatado. É visível a formação de um halo em redor da cultura de estirpes positivas.

Juarez *et al.* 1993), quatro dias para *Candida parapsilosis* (Fusek *et al.* 1993), duas horas para *Candida humicola* (Ray *et al.* 1992), uma semana para o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* (Tsuboi *et al.* 1987) e duas semanas para fungos filamentosos dermatófitos (Muhsin *et al.* 1997). Isso pode dever-se a diferentes factores: composição química do meio, crescimento mais lento ou ao facto dos testes terem sido feitos em meio sólido (nos trabalhos citados as actividades foram avaliadas em meio líquido).

A técnica de clarificação em meio sólido tem por vezes o inconveniente de se desenvolverem zonas opacas em torno das colónias em vez de halos claros (Chen *et al.* 1996a). Este fenómeno foi observado em alguns dos nossos testes com caseína. É provável que esteja relacionado com o tipo de proteína, com as concentrações de sais ou com as condições de crescimento da levedura e parece ser causado pela precipitação dos produtos da hidrólise no meio de cultura.

Todos os isolados de *C. neoformans* estudados hidrolisaram a gelatina. No entanto, esta levedura necessitou, uma vez mais, de um período de tempo mais prolongado (seis a oito semanas) comparativamente ao observado com outras leveduras - três semanas (Yarrow 1998).

A produção de proteases aspárticas (SAPs) pelas estirpes de *C. neoformans* estudadas foi variável (Fig. 2.10). A síntese das SAPs parece variar com a estirpe e não

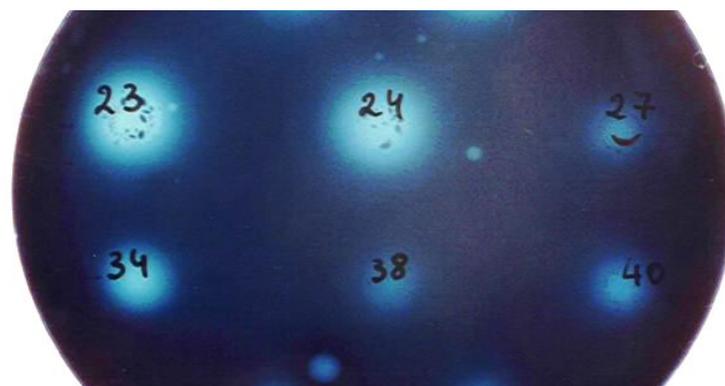


Fig. 2.10 - Produção de proteases aspárticas por estirpes de *Cryptococcus neoformans* em meio YCB com BSA, após revelação com Preto de Amido. Os números indicam a designação das estirpes.

ser uma característica da espécie. A quase totalidade das estirpes produziu uma actividade que foi visível unicamente nas zonas limitadas pelo crescimento da colónia e na zona circundante muito próxima. Apenas em três estirpes provenientes de amostras clínicas (CN 23, CN 24 e CN 109) foi observado o aparecimento de halos de maior dimensão, que ultrapassavam o dobro do diâmetro da colónia e poderiam corresponder à difusão da enzima no meio de cultura. Em oposição ao número abundante de publicações sobre trabalhos relacionados com a produção de SAPs em *C. albicans* e o seu papel na virulência deste fungo, são raras as referências a estas enzimas em *C. neoformans* (Brueske 1986, Salkowski & Balish 1991).

Inicialmente, considerava-se que *C. neoformans* não tinha actividade proteolítica (Staib *et al.* 1965). Müller e Sethi (1972) demonstraram, pela primeira vez, que esta levedura tinha a capacidade de degradar um total de treze proteínas do plasma humano, incluindo a albumina humana. Desde então vários investigadores se têm debruçado sobre este assunto, encontrando evidência para a produção de proteases.

Goodley e Hamilton (1993) purificaram uma protease de *C. neoformans*, produzida essencialmente no final da fase exponencial de crescimento, que era mais activa a 25°C do que a 37°C. Testes subsequentes revelaram ser activa em relação à azocaseína, azoalbumina, elastina, laminina e fibronectina na gama pH 7,5-8,5. Por *Western-blot*, foi identificada uma protease homóloga directamente a partir do soro de cinco doentes com criptococose.

Aoki *et al.* (1994) estudaram o crescimento e a indução da actividade proteolítica em isolados clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans* em meios sólido e líquido com BSA. Verificaram que a produção enzimática era muito superior se o meio, para além de BSA, fosse suplementado com uma pequena quantidade de peptona facilmente utilizável e que funcionaria como indutor da síntese de proteases. A actividade proteolítica também está muito condicionada às condições de temperatura e pH. Alterações nestes parâmetros modificam a estabilidade da(s) enzima(s) e limitam ou inibem a sua produção (Muhsin *et al.* 1997). Deste modo, é possível que as condições utilizadas neste trabalho possam não ter sido as óptimas para as enzimas em causa, não só para a sua actividade como para o tempo necessário para as detectar.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

3.1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico de leveduras patogênicas em laboratórios de micologia clínica tem-se baseado essencialmente em caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, mas não é raro surgirem dificuldades na identificação de alguns isolados devido à variabilidade natural das espécies, pleomorfismos ou a mutações espontâneas que nos permitem a observação de características diferenciais. Estes métodos fenotípicos não são, portanto, suficientemente fiáveis e são, por outro lado, trabalhosos e morosos.

Embora a introdução de metodologias enzimáticas e serológicas tenha contribuído, nos últimos anos, para abreviar e, de certa forma, melhorar a sensibilidade do diagnóstico laboratorial, continua a ser premente um método de identificação ainda mais específico e sensível que satisfaça de forma eficaz as solicitações da clínica médica.

O impacto crescente da aplicação de técnicas moleculares, quer na elucidação das relações filogenéticas entre diferentes grupos de organismos (Guého *et al.* 1989), quer no desenvolvimento de novos métodos de identificação (Fell 1995, Varma & Kwon-Chung 1992), tem resultado numa explosão de trabalhos científicos que têm procurado na caracterização molecular alternativas à identificação fenotípica tradicional que requer o isolamento do microrganismo em cultura pura.

3.1.1. Caracterização e Identificação Molecular de *Cryptococcus neoformans*

Os métodos moleculares para a identificação de leveduras têm aparecido na senda dos utilizados em bacteriologia. Assim, nos últimos 20 anos a definição de espécie em levedura, também porque em muitas leveduras não foram observadas estruturas sexuadas, passou a incorporar uma análise comparativa do genoma total com espécies fenotipicamente próximas. Esta análise inclui a determinação do conteúdo em guanina e citosina (% mol G+C) do DNA nuclear e a determinação da cinética de reassociação DNA-DNA. Mais recentemente, a determinação das sequências nucleotídicas de regiões menos

conservadas do DNA, nomeadamente a designada região D1/D2 do gene da subunidade 26S do RNA ribossómico, tem contribuído significativamente para a definição de novas espécies e estabelecimento de relações filogenéticas. Naturalmente, a levedura *Cryptococcus neoformans* não foge a estes consensos entre taxonomistas.

Análise comparativa do genoma total

A relação entre a temperatura de desnaturação e a composição em bases do DNA foi demonstrada, em 1959, por Marmur e Doty (Marmur & Doty 1962). Esta demonstração baseia-se no conhecimento de que se estabelecem três ligações de hidrogénio entre as bases guanina e citosina, enquanto que apenas duas ligações do mesmo tipo existem entre a tiamina e a adenina. Uma percentagem superior das primeiras confere maior estabilidade à dupla cadeia de DNA e a desnaturação ocorre a temperaturas mais elevadas.

Como para os DNAs muito ricos em guanina e citosina o valor da temperatura de desnaturação (T_m) ultrapassava os limites aceitáveis em termos experimentais, passaram a ser utilizadas soluções com menor força iónica de modo a fazer baixar o valor de T_m .

As leveduras ascomicetas apresentam uma composição em bases que varia entre 27 e 50%, enquanto os genomas dos basidiomicetas tem um conteúdo em GC entre 50 e 70%. A % mol G+C de *C. neoformans* var. *neoformans* foi determinada por diferentes autores e varia entre 43-45% (Erke & Schneidau 1973) e 53,4-57,8% (Aulakh *et al.* 1981), com outras determinações a rondar os 50% (Barnett *et al.* 2000). Diferenças de valores tão acentuadas devem ser resultado da utilização de diferentes metodologias (Kurtzman 1998, Storck *et al.* 1969): perfis de desnaturação térmica, ultracentrifugação em gradientes de cloreto de céσιο ou HPLC.

Considera-se que estirpes pertencentes a uma mesma espécie podem divergir até cerca de 2,0-2,5% na % mol G+C (Kurtzman & Fell 1998). No entanto, como a composição em bases não reflecte a sequência nucleotídica do DNA, as estirpes com percentagens molares idênticas podem pertencer a espécies diferentes. O conteúdo em GC permite, essencialmente, uma comparação genómica primária: se é significativamente diferente terá de corresponder a espécies diferentes, composições semelhantes requerem experiências subsequentes de reassociação DNA-DNA para determinar a conspecificidade.

As experiências de reassociação DNA-DNA permitem avaliar a complementaridade das sequências nucleotídicas dos DNAs de duas estirpes diferentes. Quando se seguem as diferenças em absorvência a 260 nm, a determinação é feita após a desnaturação térmica do DNA das amostras comparando as cinéticas de renaturação do DNA de cada uma das estirpes e da sua mistura em partes iguais.

A renaturação do DNA depende das colisões casuais das cadeias com sequências complementares, seguindo uma cinética de segunda ordem: um fragmento de DNA de cadeia simples, em solução, irá hibridar com fragmentos complementares em função da sua concentração e complexidade genómica. A cinética de reassociação depende da concentração do DNA e da temperatura (Britten & Kohne 1968). Outros factores que afectam as reacções de reassociação DNA-DNA são a concentração de cationes no tampão, o tempo de incubação após desnaturação e o comprimento dos fragmentos de DNA. Considera-se, em geral, que a temperatura óptima de reassociação é cerca de 25°C inferior ao valor de T_m obtido nas mesmas condições.

Existem vários métodos que permitem a determinação do grau de complementaridade entre DNAs de duas estirpes. Podem ser utilizados radio-isótopos para marcação directa do DNA ou através da síntese *in vivo* de RNA complementar marcado, quimioluminescência, hibridação com DNA imobilizado em filtros de nitrocelulose, cromatografia em hidroxiapatite ou espectrofotometria (Kurtzman & Fell 1998).

A determinação quantitativa da complementaridade genómica entre duas estirpes microbianas através da evolução, seguida por espectrofotometria, da cinética da formação do duplex foi inicialmente proposta por De Ley *et al.* (1970) com base na comparação das velocidades iniciais de reassociação do DNA de dois indivíduos, isoladamente e em mistura.

Na apreciação da conspecificidade entre estirpes através de experiências de reassociação DNA-DNA, o grau de semelhança global entre os respectivos genomas constitui um método de eleição generalizada para a definição de espécie. Estirpes com 70-80% de complementaridade DNA-DNA são consideradas como pertencentes à mesma espécie (Grimont 1988, Kurtzman & Pfaff 1987). Contrariamente, considera-se não pertencerem à mesma espécie estirpes com menos de 20-30% de semelhança DNA-DNA. Os valores intermédios, homologia entre os 30-70%, deverão ser analisados em conjunto com outras características e poderão corresponder a variedades. A reassociação DNA-DNA permite avaliar se espécies fenotipicamente distintas se reduzem a uma mesma espécie

(Boekhout *et al.* 1993, Guého & Meyer 1989, Hamamoto *et al.* 1987, Kurtzman 1998) ou se a uma espécie fenotipicamente homogênea poderá corresponder mais do que uma espécie genotípica (Guého 1984, Guého *et al.* 1992a, *idem* 1992b, Hamamoto *et al.* 1987, Martini & Martini 1992).

Erke e Schneidau (1973) determinaram as percentagens de homologia entre os DNAs de estirpes típicas de *C. neoformans* e estirpes atípicas produtoras de micélio e demonstraram que correspondiam à mesma espécie. Aulakh *et al.* (1981) determinaram a percentagem de semelhança genómica intra e intervarietal em *C. neoformans*. Observaram que entre estirpes da mesma variedade a homologia era elevada (~90%), mas que entre estirpes das duas variedades (*neoformans* e *gattii*) os valores indicavam uma menor complementaridade entre DNAs (55 a 63%), o que está de acordo com o esperado.

Sequenciação de regiões da unidade do DNA ribossómico

Em leveduras, tal como noutros eucariontes, os genes do RNA ribossómico (rRNA) estão organizados numa unidade de DNA ribossómico (rDNA) que se repete em tandem em várias dezenas de cópias, dependente da levedura, por genoma haplóide. Em muitas leveduras, os genes de rRNA da pequena (17-18S) e grande sub-unidades (26S, 5S e 5,8S) situam-se numa unidade comum, embora o gene de rRNA 5S seja transcrito separadamente (noutras leveduras o gene do rRNA 5S encontra-se repetido noutro local do genoma). Os genes dos rRNA 18S, 5,8S e 26S formam uma única unidade transcricional.

A unidade de rDNA de todos os indivíduos estudados tem regiões estruturais altamente conservadas, na maioria situadas nos genes de rRNA, e alguns domínios mais variáveis, geralmente localizados nas regiões intergénicas. As variações observadas têm permitido estabelecer relações evolutivas entre os diferentes indivíduos e distingui-los a vários níveis da hierarquia taxonómica.

A utilização do rDNA em estudos deste tipo oferece uma série de vantagens: (i) os ribossomas estão presentes em todos os organismos; (ii) são homólogos sob o ponto de vista funcional e evolutivo; (iii) parecem partilhar de uma origem evolutiva comum pois, apesar de serem muito conservados, revelam diferentes níveis de evolução, podendo funcionar como cronómetros moleculares; (iv) os genes do rRNA parecem não variar entre indivíduos contemporâneos, reflectindo somente as relações evolutivas entre os organismos; (v) a quantidade de informação que se pode obter através do estudo das

sequências dos genes de rRNA (26S, 18S, 5,8S e 5S), os quais têm um total de mais de 6000 nucleótidos, é suficientemente elevada para apreciar filogenias e fazer a respectiva análise estatística; (vi) a utilização de *primers* dirigidos para uma determinada região do rDNA permite um fácil acesso, através da amplificação por PCR, a qualquer zona da unidade, o que facilita muito o estudo de um número muito elevado de amostras (Fell *et al.* 2000a); (vii) a existência de várias bases de dados de sequências já conhecidas de rDNA (GenBank, *Ribosomal Database Project*, ARB) permite comparar sequências de um número muito elevado e diversificado de organismos (Guého *et al.* 1989, Peterson & Kurtzman 1991, Van de Peer *et al.* 1999). A inferição sobre filogenias com base na análise das sequências nucleotídicas dos genes ribossômicos pode abranger, inclusivamente, organismos que nunca tenham sido isolados em cultura, desde que seja isolado o seu DNA (Amann *et al.* 1995).

O complexo de genes do rDNA está localizado num dos cromossomas maiores de *C. neoformans* (Perfect *et al.* 1989) e já foi clonado (Restrepo & Barbour 1989) e sequenciado (Fan *et al.* 1994, Fan *et al.* 1995). A unidade de rDNA tem aproximadamente 8kb. A sua dimensão varia com a estirpe, podendo as diferenças atingir as 400 bases (Casadevall & Perfect 1998). Em *C. neoformans*, o gene de rDNA 5S está incluído na unidade repetitiva de rDNA (Fig. 3.1) e é transcrito no mesmo sentido dos outros genes (Kwon-Chung & Chang 1994).

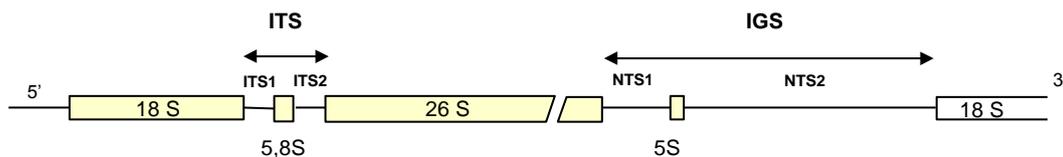


Fig. 3.1 - Representação esquemática da unidade de DNA ribossômico em *Cryptococcus neoformans*. Abreviaturas: ITS1 e ITS2, espaçadores transcritos (*Internal Transcribed Spacers*); NTS1 e NTS2, espaçadores não-transcritos (*Non-Transcribed Spacers*); IGS, espaçador intergênico (*Inter-Genic Spacer*).

Gutell e Fox (1988) demonstraram que a extremidade 5' do rDNA 26S (com cerca de 4700 nucleótidos no total) de um número muito diversificado de organismos era suficientemente variável para permitir a diferenciação de espécies próximas. Guého *et al.* (1989) e, posteriormente, Peterson e Kurtzman (1991) sequenciaram esta região do genoma de leveduras pertencentes a diferentes géneros. Confirmaram que essa região, designada por D1/D2 (cerca de 600 nucleótidos), tinha a particularidade de apresentar

simultaneamente regiões variáveis e regiões conservadas e que, nestas últimas, as estruturas primárias e secundárias pareciam suficientemente homólogas para permitir estabelecer relações filogenéticas (Fell & Kurtzman 1990). As diferenças observadas na sequência dos nucleótidos dessa região eram suficientes para separar espécies de leveduras muito próximas (Fell & Kurtzman 1990, Guardet *et al.* 1989, Guého *et al.* 1993, Kurtzman 2000). Verificou-se que estirpes da mesma espécie podem apresentar diferenças nucleotídicas nesta região até 5,1%. Quanto mais afastadas forem as espécies, maior é a divergência entre as sequências (Peterson & Kurtzman 1991).

Foi exactamente com base nas sequências da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de uma série de leveduras de interesse clínico que Fell (1995) desenhou *primers* específicos para as diferentes espécies. Demonstrou, utilizando apenas as estirpes-tipo de cada uma das espécies, que o respectivo *primer* específico permitia a amplificação de um fragmento que só era observado quando o DNA da espécie correspondente estava presente. Os outros *primers* utilizados neste estudo estavam localizados nas extremidades conservadas de D1/D2 e conduziam a um produto de amplificação de tamanho semelhante para todas as leveduras analisadas.

Outras regiões do DNA têm sido analisadas com os mesmos objectivos, estabelecer relações filogenéticas e diferenciar leveduras ao nível da espécie ou do género. As mais estudadas são o gene do rRNA 18S e a ribotipagem baseada nos polimorfismos das regiões espaçadoras ITS1 e ITS2. Estão descritos vários métodos que utilizam a amplificação por PCR desta região específica, seguida de sequenciação ou de uma análise dos polimorfismos de restrição. Em *C. neoformans* foram estudadas outras regiões das subunidades maior (26S) e menor (18S) do rDNA por Guého *et al.* (1989), mas mostraram níveis de variação insuficientes para uma distinção fiável entre esta espécie e outras que lhe são próximas.

Outros métodos

Muitos outros métodos têm sido utilizados na caracterização e identificação molecular de *C. neoformans*. A maioria dos trabalhos envolve isolados clínicos e ambientais e os trabalhos mais recentes têm tido a preocupação de estudar isolados provenientes de diferentes áreas geográficas.

Os inúmeros trabalhos realizados com esta levedura patogénica incluíram técnicas moleculares variadas, tais como cariotipagem electroforética de campo pulsado - PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) (Perfect *et al.* 1989, Polacheck & Lebens 1989), perfis electroforéticos de isoenzimas - MEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) (Brandt *et al.* 1993), análise dos polimorfismos de restrição - RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) do DNA genómico (Currie *et al.* 1994) e do DNA mitocondrial (Varma & Kwon-Chung 1989), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Spitzer & Spitzer 1992, Yamamoto *et al.* 1995), hibridação por *Southern blot* com sondas de sequências repetitivas de DNA de *C. neoformans* (Varma *et al.* 1995) e polimorfismos de regiões microssatélites - MS-PCR (*Micro Satellite primed-PCR*) (Meyer *et al.* 1993).

Apesar de nalguns desses trabalhos se ter utilizado um número representativo de estirpes de *C. neoformans*, limitam-se a descrever a aplicação de uma determinada técnica e a comentar a informação obtida. Não houve a preocupação de estudar estirpes certificadas, que tivessem sido sujeitas a uma caracterização mais vasta e integrada. Por outro lado, o objectivo da sua implementação num laboratório de micologia clínica para uma identificação de rotina era mais ou menos longínquo, i.e., o interesse era essencialmente de natureza fundamental.

3.1.2. Variabilidade Intraspecífica em *Cryptococcus neoformans*

Estudos epidemiológicos, a avaliação da etiologia de infecções recidivantes ou a detecção de variações na resistência aos fármacos antifúngicos podem exigir a diferenciação de *C. neoformans* ao nível da estirpe. Várias abordagens têm sido utilizadas em leveduras para este mesmo fim, nomeadamente em leveduras de processo (produção de vinho, cerveja ou pão) para manter a uniformidade do produto e evitar apropriações indevidas pela concorrência. As leveduras de interesse clínico, como *Candida albicans*, também têm suscitado vários trabalhos sobre este tema. Entre os muitos métodos experimentados, salientamos os polimorfismos de restrição do DNA mitocondrial (mtDNA) e do rDNA e a tipagem baseada nos perfis de amplificação por PCR utilizando como *primers* oligonucleótidos repetidos com frequência no genoma. Nesta introdução, iremos referir em mais detalhe apenas as metodologias utilizadas neste trabalho e seleccionadas pela sua simplicidade, sensibilidade e rapidez de execução.

Polimorfismos de regiões microssatélites (MS-PCR)

No DNA das células eucarióticas, para além dos genes repetidos em tandem, existem grupos de pequenas sequências repetidas e não transcritas. Essas sequências foram inicialmente designadas por DNA satélite porque, após uma centrifugação em gradiente de CsCl, se separavam do restante DNA formando uma banda-satélite. Conforme o número de nucleótidos da unidade que se repete em tandem assim se convencionou (Meyer *et al.* 1993) denominar por DNA microssatélite (2 a 9 nucleótidos) ou minissatélite (10 a 30 nucleótidos). O número de repetições dessas sequências é elevado, somaticamente estável para cada indivíduo, ligeiramente variável entre estirpes da mesma espécie e hipervariável entre indivíduos de espécies diferentes. As sequências mini/microssatélites encontram-se distribuídas nos cromossomas, localizando-se principalmente nas regiões teloméricas e centroméricas. Devido a estas características são considerados bons marcadores moleculares, pois eventualmente possibilitam a diferenciação de indivíduos ou de populações através da análise do polimorfismo existente nestas regiões de DNA repetido e nas distâncias que as separa.

A técnica que utiliza *primers* dirigidos para sequências satélite em reacções de amplificação por PCR é geralmente designada por MS-PCR. Vários *primers* têm sido usados para amplificar regiões de DNA satélite, mas os que permitiram obter os resultados mais consistentes e reprodutíveis em *C. neoformans* e em espécies de *Candida* patogénico-opportunistas foram o núcleo do fago M13 com a sequência minissatélite (5' GAG GGT GGC GGT TCT 3') e os *primers* microssatélites (GTG)₅ e (GACA)₄, com especial ênfase para este último (Meyer & Mitchell 1995, Meyer *et al.* 1993, *idem* 1997). A sequência do *primer* M13 foi detectada em múltiplas cópias espalhadas no genoma humano. Ao ser aplicado a outros eucariontes, como por exemplo leveduras, este *primer* demonstrou ter um elevado poder de resolução.

Foi demonstrado que esta técnica aplicada a *C. neoformans* permitiu inferir sobre as estirpes que foram causa de criptococose em doentes diferentes e sobre as estirpes que estavam na origem de recidivas no mesmo doente (Haynes *et al.* 1995b, Meyer *et al.* 1993, *idem* 1999, Sullivan *et al.* 1993). Os resultados mostraram também que estirpes clínicas e ambientais podiam ter padrões de produtos de amplificação idênticos, sugerindo que as infecções poderiam ser contraídas a partir da inalação de partículas do meio ambiente (Pernice *et al.* 1998).

Para além das vantagens já referidas, esta técnica não necessita de um DNA genómico muito purificado e pode ter inúmeras aplicações em que seja preciso analisar muitos isolados com a mesma origem ou provenientes de ambientes diversos (Meyer *et al.* 1997, *idem* 1999).

Polimorfismos de restrição (RFLP) da região IGS do rDNA

A utilização de endonucleases de restrição permite detectar variações em sequências do DNA genómico e analisar os polimorfismos dos perfis electroforéticos dos fragmentos resultantes. Estas enzimas reconhecem sequências específicas do DNA, geralmente entre quatro a seis nucleótidos, e cortam o DNA no interior ou junto do local de reconhecimento. Alterações na sequência de reconhecimento por substituição de nucleótidos, inserções ou deleções impedem a acção da endonuclease, o que se traduz numa mudança no padrão de fragmentos obtidos. As mutações no comprimento da sequência do DNA entre dois locais de restrição também podem alterar o padrão dos fragmentos. Quando associada à amplificação por PCR, a técnica de RFLP permite estudar variações genéticas em estirpes de uma mesma espécie em relação a qualquer região do DNA.

Os genes de rRNA apresentam, devido à pressão selectiva à qual estão sujeitos, níveis elevados de conservação em todos os organismos. No entanto, como já foi referido, as sequências intergénicas estão sujeitas a uma pressão selectiva que, embora se mantenha elevada devido à contiguidade dos genes ribossómicos, é inferior à que é exercida sobre estes.

Fan e colaboradores (1994, 1995) amplificaram, clonaram e sequenciaram os IGS (entre a extremidade 5' do rDNA 26S e a extremidade 3' do rDNA 18S) do rDNA de 12 estirpes das duas variedades de *C. neoformans*. Observaram que o número de bases dessa região variava entre 450-550 pb e que a sua composição em nucleótidos era caracterizada pela presença de fragmentos curtos com repetições GC (cerca de 19 bases). Observaram também que as sequências IGS das duas variedades revelavam um grau de variabilidade mais elevado (78,5%) do que as sequências dos genes do rRNA (>99%). Foi com base nessas diferenças que os autores sugeriram que as variedades *neoformans* e *gattii* sofreram uma divergência evolutiva relativamente recente.

Diaz *et al.* (2000) estudaram a variabilidade genética de um número elevado de estirpes clínicas e ambientais de *C. neoformans*, de todos os serotipos, com base na análise

das sequências da região IGS (entre a extremidade 3' do rDNA 26 S e a extremidade 5' do rDNA 18S) e verificaram existirem diferenças significativas na composição nucleotídica não só entre estirpes de variedades diferentes como entre estirpes da mesma variedade. Outros estudos existem sobre os polimorfismos dos padrões de restrição da mesma região do rDNA de outros fungos: *S. cerevisiae* (Jemtland *et al.* 1986), *Aspergillus fumigatus* (Spreadbury *et al.* 1990), *C. albicans* (Rustchenko *et al.* 1993), leveduras do género *Mrakia* (Diaz & Fell 2000) e um grande número de basidiomicetas (Fell *et al.* 2000b), tendo também sido observada uma grande variabilidade intraspecífica em cada uma das espécies. Parece, pois, que os polimorfismos de restrição das regiões IGS do rDNA permitem pôr em evidência as diferenças existentes entre as sequências de estirpes diferentes ou de um grupo de estirpes muito semelhantes. O estudo das regiões IGS tem sido considerado, portanto, uma ferramenta muito útil na diferenciação de estirpes pertencentes a uma mesma espécie (Diaz & Fell 2000, Diaz *et al.* 2000).

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Estirpes Estudadas

A técnica de PCR, utilizando o *primer* específico para *C. neoformans*, foi testada com o DNA das 51 estirpes seleccionadas para este trabalho e fenotipicamente identificadas como *C. neoformans* (Tabelas 2.2 e 2.3). A mesma técnica foi aplicada ao DNA de 21 espécies de leveduras diferentes de *C. neoformans*, utilizadas como controlo negativo. Todas as estirpes foram também isoladas a partir de amostras clínicas (Tabela 3.1). As estirpes analisadas com outros métodos referidos neste capítulo encontram-se assinaladas quando essas metodologias são descritas.

Tabela 3.1 - Leveduras isoladas a partir de amostras clínicas e utilizadas como controlos negativos para a amplificação por PCR com o *primer* específico para *Cryptococcus neoformans*.

<i>Candida albicans</i> (IHMT 2588/96)	<i>Candida intermedia</i> (IHMT 649/97)
<i>Candida parapsilosis</i> (IHMT 195/98)	<i>Candida famata</i> (IHMT 415/98)
<i>Candida krusei</i> (IHMT 527/97)	<i>Trichosporon cutaneum</i> (IHMT 256/97)
<i>Candida curvata</i> (IHMT 658/97)	<i>Cryptococcus albidus</i> (IHMT 71/97)
<i>Candida glabrata</i> (IHMT 120/98)	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> (IHMT 22/98)
<i>Candida tropicalis</i> (IHMT 388/98)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IHMT 1118/94)
<i>Candida guilliermondii</i> (IHMT 45/99)	<i>Kloeckera apis</i> (IHMT 526/97)
<i>Candida zeylanoides</i> (IHMT 81/98)	<i>Geotrichum</i> sp. (IHMT 124B/99)
<i>Candida humicola</i> (IHMT 64/97)	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. (IHMT 40/98)
<i>Candida kefyr</i> (IHMT 422/98)	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (IHMT 2446/96)

3.2.2. Extracção e Purificação de DNA

Para a aplicação de técnicas moleculares é essencial começar por obter DNA do organismo em questão em estado razoavelmente puro. Para garantir essa pureza com o DNA de *C. neoformans* foi necessário ultrapassar questões de ordem metodológica relacionadas com a cápsula polissacarídea, a parede celular e a presença de concentrações elevadas de nucleases produzidas por esta levedura.

Extracção rápida de DNA para PCR

A técnica de PCR não exige que o DNA tenha um elevado grau de pureza e concentração, o que possibilita uma extracção muito mais rápida.

Num tubo Eppendorf (1,5 ml) com 500 μ l de Tampão de Lise (ver Apêndice) e um volume de esferas de vidro (0,4-0,6 mm de diâmetro) equivalente a 200 μ l é feita uma suspensão celular muito densa. Agita-se muito fortemente a suspensão no Vortex, durante 3 min, e coloca-se num banho a 65°C durante 1 h. Em seguida, a suspensão é novamente agitada no Vortex durante 3 min e centrifugada durante 10 min a 11 000 g. Recupera-se o sobrenadante, que contém o DNA, para um novo tubo e guarda-se a -20°C. O DNA nestas condições mantém-se em bom estado por um período superior a um ano.

Preparação do DNA para PCR: é feita uma diluição (1:750) da solução de DNA em água bidestilada esterilizada e guardam-se alíquotas (100 μ l) a -20°C. Assim diluído, o DNA mantém-se em bom estado durante alguns meses.

Extracção de DNA para análise do genoma total

Condições de cultura

A levedura foi inoculada, a partir de uma cultura jovem em meio de manutenção, em 1 litro de meio líquido YM (ver Apêndice), pH 6, num balão Erlenmeyer (2 litros), depois incubado a 30°C com agitação orbital (150 rpm) até obtenção de uma densidade óptica ($\lambda=640$ nm) superior a 2 (espectrofotómetro SHIMADZU UV-1201). A duração da incubação foi de 3 a 4 dias, excepto para a estirpe CN 2 que foi de 7 dias. As estirpes muito mucosas (CN 112, PYCC 5025, PYCC 5026, PYCC 5027 PYCC 5028) foram cultivadas em meio Sabouraud com 16% (p/v) de glucose, a pH 4,2, e incubadas a 15°C para reduzir a produção de polissacáridos (Mitchell & Perfect 1995).

Extracção de DNA

As células foram recolhidas por centrifugação a 10 000 g, a 4°C, durante 5 min (centrífuga Sorvall RCF RC-5) e lavadas duas vezes com água destilada e uma vez com EDTA salino (NaCl 0,15M; EDTA 0,1M; pH 8,0) para a inibição das nucleases (Britten *et al.* 1970). Por cada 6 g de peso húmido de células foram adicionados 9 ml de Tampão de Lise e a suspensão foi congelada a -70°C durante pelo menos 12 h. A partir deste passo todo o

material usado passou a ser esterilizado, excepto as colunas e os tubos de vidro. Estes são unicamente passados por mistura nitro-sulfúrica a fim de inactivar as DNAses.

As células foram rebentadas com o auxílio de uma prensa hidráulica do tipo Eaton, e recolhidas directamente para tubos de centrífuga. Verificou-se, por observação microscópica, se a percentagem de células rebentadas atingia os 60%. Em caso negativo, o passo anterior era repetido. A suspensão celular foi centrifugada a 16 000 g, a 0°C, durante 30 min. O sobrenadante foi recuperado, tendo o cuidado de não recolher a banda superficial proteica (esbranquiçada).

Purificação de DNA

O DNA foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de hidroxiapatite. Esta resina adsorve selectivamente moléculas de DNA de cadeia dupla na presença de ureia (Britten *et al.* 1970). A ureia aumenta a afinidade do DNA nativo, diminui a afinidade do RNA e funciona como desnaturante das proteínas. Reduz, deste modo, a actividade enzimática, nomeadamente das nucleases, para além de ajudar a romper as células e a estrutura da cromatina. Apesar de outras moléculas também poderem ficar retidas na coluna, a eluição selectiva do DNA faz com que através deste método se obtenha DNA nativo com elevado grau de pureza (Britten *et al.* 1970).

Antes de adicionar a solução de DNA, a coluna de hidroxiapatite foi preparada do seguinte modo: 3 g de hidroxiapatite foram lavados por duas vezes, com um intervalo de 15 min, com 20 ml de Tampão de Lavagem (WB). A suspensão é então transferida cuidadosamente para uma coluna (4 x 20 cm) previamente fixada na vertical e ligada a uma bomba peristáltica. Depois de retirar o excesso de tampão WB da hidroxiapatite, sem a deixar secar, adiciona-se o sobrenadante que contém o DNA. A resina é depois lavada com tampão WB até que a absorvência a 260 nm seja aproximadamente 0,005, valor que indica que os contaminantes indesejáveis (proteínas, RNA e polissacáridos) foram removidos.

Em seguida, são passados 30 ml de Tampão Fosfato Diluído (ver Apêndice) através da coluna para a remoção da ureia. Por fim, o DNA é eluído com Tampão de Eluição (ver Apêndice) seguindo a variação de absorvência a 260 nm. O eluído com uma absorvência igual ou superior a 0,5 é recolhido e dialisado em membranas de diálise em SSC 0,1M a 4°C durante 48 h, com agitação magnética suave (substituição completa do tampão ao fim das primeiras 24 h).

Para concentrar o DNA, adiciona-se à solução dialisada 2 volumes de etanol absoluto e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M. A mistura é homogeneizada por inversões suaves e colocada a -70°C durante pelo menos 30 min até a solução ficar viscosa. Em seguida, é centrifugada a 16 000 g durante 30 min, ficando o DNA precipitado junto às paredes do tubo. Despreza-se o sobrenadante e o DNA é lavado suavemente com etanol a 70% (v/v) e depois seco sob vácuo. Ressuspende-se o DNA em tampão SSC 0,1 M.

Determinação da pureza da solução de DNA

A pureza da solução de DNA é avaliada espectrofotometricamente através das razões entre as absorvências a 230 nm, 260 nm e 280 nm. Se a amostra de DNA estiver pura, as razões entre as absorvências deverão estar compreendidas nos seguintes intervalos:

$$1,65 \leq A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} \leq 1,85$$

$$0,45 \leq A_{230 \text{ nm}} / A_{260 \text{ nm}} \leq 0,55$$

Os valores de $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ inferiores a 1,65 indicam contaminação com proteína ou com fenol e superiores a 1,85 contaminação com RNA (Guého *et al.* 1993, Sambrook *et al.* 1989). Valores de $A_{230 \text{ nm}} / A_{260 \text{ nm}}$ superiores a 0,55 indicam contaminação com RNA ou com polissacáridos (Guého *et al.* 1993).

3.2.3. Amplificação por PCR com *Primer* Específico

Para testar a especificidade do *primer* desenhado por Fell (1995) para as estirpes de *C. neoformans* analisadas neste trabalho, foi utilizado, numa mesma reacção de PCR, esse *primer* e dois *primers* universais, os quais é suposto conduzirem à amplificação da região D1/D2 do gene da subunidade 26S do RNA, produzindo um fragmento de ~600 pb na presença de DNA de qualquer levedura. O *primer* específico para *C. neoformans* é interno para essa região e, na presença de DNA alvo, resulta na amplificação de um fragmento de ~200 pb. (Fig. 3.2).

Os *primers* universais utilizados foram: NL1 (*forward* - 5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL4 (*reverse* - 5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'). O *primer* específico para *C. neoformans* foi CN1 (*forward* - 5' AGT TCT GAT CGG TGG ATA AGG GCT). Todos os *primers* foram fornecidos por Amersham Pharmacia Biotech.

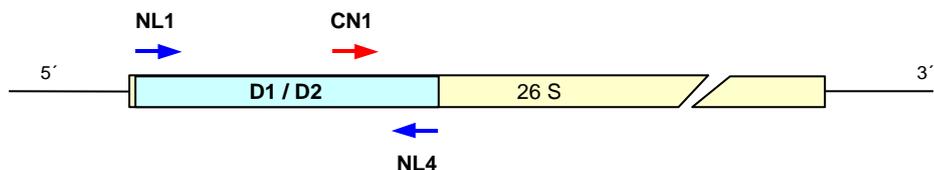


Fig. 3.2 - Representação esquemática da região D1/D2 do gene da subunidade 26S do RNA ribossômico. Estão indicados os locais de hibridação dos *primers* utilizados no diagnóstico de *Cryptococcus neoformans*. NL1, NL4 - *primers* universais; CN1 - *primer* específico.

Reacção de PCR

Em cada tubo de reacção (Eppendorf 0,2 ml) foram adicionados os diferentes reagentes, conforme consta na Tabela 3.2. No tubo do controlo negativo o DNA foi substituído por água bidestilada esterilizada.

Tabela 3.2 - Reagentes nas reacções de PCR.

Reagente	Concentração final	Volume (μ l)
Água bidestilada		6 μ l
Tampão 10 X	1x	2,5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	3,5 mM	2 μ l
dNTPs (1,25 mM cada)	250 μ M cada dNTP	5 μ l
Mistura dos <i>primers</i> (5 μ M)	0,8 μ M para cada <i>primer</i>	4 μ l
<i>Taq</i> polimerase (Pharmacia)	1 U	0,2 μ l
DNA diluído 1:750	1:3750	5 μ l
Total:		25 μ l

Foi utilizado o termociclador Uno II Thermal Cycler (Biometra). O programa consistiu numa desnaturação inicial de 2 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificação: desnaturação de 30 s a 94°C, hibridação dos *primers* durante 90 s a 56°C e extensão de 30 s a 72°C, com uma extensão final de 4 min a 72°C.

Visualização dos produtos de amplificação

Para a detecção dos produtos de amplificação foi realizada uma electroforese em gel de agarose (Gibco, BRL) revelado, após a corrida, com brometo de etídio. Para a electroforese, foram adicionados 10 μ l de cada amostra resultante da amplificação por PCR a 2 μ l da solução de aplicação corada. Aplicou-se a mistura num gel de agarose a 2% em

TAE 0,5% com 0,5 µg/ml de brometo de etídio incorporado. O marcador de pesos moleculares utilizado foi GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus® - FERMENTAS. A electroforese decorreu a 50V durante 45 min num aparelho MUPID2, Cosmo Bio. As bandas foram visualizadas num transiluminador de luz UV e as imagens captadas com o sistema Kodak Digital Science EDA 120 System e digitalizadas com o software Kodak Digital Science 1D Image Analysis.

3.2.4. Análise Comparativa do Genoma Total

As estirpes para as quais não se observou a banda específica na amplificação por PCR tiveram de ser analisadas através de métodos que permitissem avaliar a conspecificidade dessas estirpes com a estirpe-tipo de *C. neoformans*. Com esse objectivo, procedeu-se à determinação do conteúdo em guanina e citosina do DNA nuclear e a experiências de reassociação DNA-DNA.

Determinação do conteúdo em guanina e citosina (%mol G+C)

Neste trabalho foi utilizada a desnaturação térmica seguida por espectrofotometria para a determinação da % mol G+C do DNA nuclear de *C. neoformans*. Este método baseia-se no acompanhamento da desnaturação do DNA através da medição da absorvência a 260 nm. Com o aumento da temperatura, o DNA desnatura e verifica-se um aumento da absorvência (Fig. 3.3).

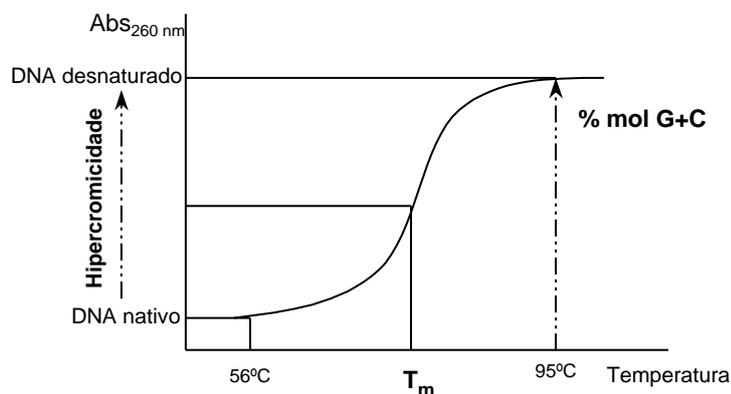


Fig. 3.3 - Curva de desnaturação térmica do DNA (adaptado de Marmur & Doty 1962).

O ponto de inflexão da curva, ou seja, a temperatura à qual 50% do DNA já se encontra desnaturado, é vulgarmente designado por T_m (temperatura de desnaturação ou

ponto hipercrômico). Este valor é tanto maior quanto mais elevado for o conteúdo em guanina e citosina do DNA. A diferença entre as absorvências do DNA nativo e totalmente desnaturado é designada por hipercromicidade.

Mandel e Marmur (1968) propuseram uma equação que relaciona a % mol G+C com o valor de T_m , em função da concentração em iões sódio:

$$\% \text{ mol G+C} = (T_m - 53,9) \cdot 2,44 \quad (3.1)$$

A composição em bases de guanina e citosina do DNA das estirpes seleccionadas foi determinada segundo o método desenvolvido por Marmur e Doty (1962). Preparou-se uma solução de DNA em SSC 0,1M com uma absorvência entre 0,3 e 0,4 a 260nm. Foram utilizadas *microcuvettes* (300 μ l) de quartzo, que são fechadas hermeticamente com as tampas vedadas com *teflon*, e o espectrofotómetro Gilford Response II-VIS (U.S.A.) equipado com *software* de programação térmica e registador. A curva de desnaturação permite ainda o cálculo do valor da hipercromicidade do DNA na preparação usada o qual deve ser pelo menos de 25%.

Nestas experiências foi usado como referência o DNA de *Candida parapsilosis* (Asford) Langeron *et* Talice PYCC 2545^T (% mol G+C = 40,2). Todas as determinações foram feitas pelo menos em duplicado e os valores referidos representam a média dos resultados obtidos.

Reassociação DNA-DNA

Neste trabalho foi igualmente utilizada a técnica espectrofotométrica. Este método assenta na comparação entre as cinéticas de renaturação do DNA de cada uma das estirpes e da sua mistura em partes iguais.

Seidler e Mandel (1971) basearam-se nas curvas de C_0t (C_0 indica a concentração inicial do DNA e t o tempo de incubação), nomeadamente no valor médio da reacção, $C_0t^{1/2}$ (quando 50% do DNA se encontra reassociado), para determinar o grau de semelhança entre indivíduos. Verificaram que quando o $C_0t^{1/2}$ da mistura era semelhante à média dos $C_0t^{1/2}$ dos indivíduos em separado, havia um elevado grau de semelhança entre eles. Quando não existia nenhuma semelhança entre os dois organismos, o valor de $C_0t^{1/2}$ da mistura era igual à soma dos valores de $C_0t^{1/2}$ de cada um separadamente. Valores de $C_0t^{1/2}$ da mistura inferiores a essa soma correspondiam a semelhanças intermédias entre os DNAs dos dois organismos.

A relação quantitativa entre os valores obtidos com a mistura de DNA e a percentagem de homologia entre esses mesmos DNAs foi formulada pelos autores da seguinte forma:

$$\% \text{ homologia} = \left(1 - \frac{C_{ot}^{1/2} \text{ mix} + (C_{ot}^{1/2} 100 - C_{ot}^{1/2} 0)}{C_{ot}^{1/2} 100} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

em que:

$C_{ot}^{1/2} \text{ mix}$	valor de $C_{ot}^{1/2}$ observado para a renaturação da mistura.
$C_{ot}^{1/2} 100$	valor que se obteria se as duas sequências de bases do DNA fossem idênticas, ou seja a média aritmética dos valores de $C_{ot}^{1/2}$ de cada um dos indivíduos.
$C_{ot}^{1/2} 0$	valor que se obteria caso as duas sequências não apresentassem semelhança, correspondendo à soma dos valores de $C_{ot}^{1/2}$ do DNA de cada indivíduo.

Nas experiências de reassociação DNA-DNA foi utilizado o espectrofotômetro Gilford Response II-VIS (U.S.A.) referido anteriormente. Em cada *cuvette* foram colocados 280 μ l da solução de DNA (de uma estirpe ou da mistura em partes iguais de duas estirpes) com uma absorvência (260 nm) de $1,50 \pm 0,02$. As *cuvettes*, fechadas hermeticamente com *teflon*, foram colocadas em simultâneo na câmara termostatizada do espectrofotômetro.

Foram registados os valores da absorvência a 56°C (DNA nativo) e a 95°C (DNA desnaturado). As *cuvettes* foram mantidas a 95°C durante 10 min, para garantir a desnaturação completa, após o que a temperatura foi rapidamente descida para 56°C ($T_m - 25^\circ\text{C}$) que corresponde à temperatura óptima de renaturação do DNA. O valor de T_m foi previamente determinado nas condições de reassociação e verificou-se ser igual a 81°C. Em seguida, e durante o tempo necessário para que ocorresse a renaturação de pelo menos 50 % de cada um dos DNAs, foram registados os valores da absorvência ao longo do tempo e à temperatura constante de 56°C. A percentagem de homologia dos DNAs das estirpes analisadas foi calculada a partir da equação 3.2. Todas as determinações foram feitas pelo menos em duplicado.

3.2.5. Sequenciação da Região D1/D2 do Gene da Subunidade 26S do RNA Ribossômico

Para sequenciar a região D1/D2 (ver Fig. 3.2) do gene da subunidade 26S do RNA ribossômico foi utilizado um protocolo de sequenciação automática baseado no método de sequenciação de Sanger e Coulson (1975) associado à marcação fluorescente dos fragmentos de DNA. O método consiste na utilização de *primers* marcados e na

determinação da sequência nucleotídica da molécula de ácido nucleico por meio da realização em paralelo de quatro reacções, uma para cada didesoxinucleótido que é incorporado na cadeia de DNA a ser amplificada parando a reacção. Os fragmentos resultantes têm tamanhos diferentes, são separados por electroforese e detectados por um laser fixo. O processo é automático e não requer a análise visual de uma autoradiografia nem registo manual dos resultados. Os resultados são gravados directamente em computador e traduzidos numa sequência através de um programa informático ou, visualmente, pelo operador.

A preparação do fragmento de DNA para a reacção de sequenciação inclui duas reacções de PCR (Fig. 3.4). O DNA molde, da estirpe a analisar, é obtido seguindo a metodologia de extracção rápida de DNA para PCR anteriormente descrita. É feita uma primeira amplificação para produzir um fragmento de cerca de 1500 pb que inclui a extremidade 3' do gene de rRNA 18S, ITS1, o gene de rRNA 5,8S, ITS2 e parte do rDNA 26S. Os *primers* utilizados foram ITS5 (*forward* - 5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3') e LR6 (*reverse* - 5' CGC CAG TTC TGC TTA CC 3') e o ciclo de PCR incluiu uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 min seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 64°C e 2 min a 72°C, com uma extensão final de 72°C durante 5 min.

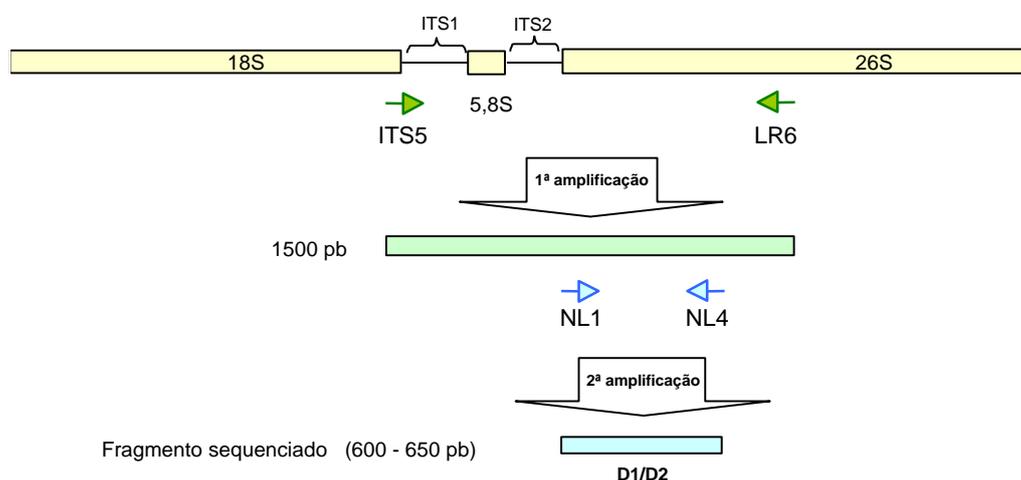


Fig. 3.4 – Representação esquemática das duas amplificações sucessivas realizadas para a sequenciação do domínio D1/D2 do rDNA 26S de *Cryptococcus neoformans*.

Em seguida, é confirmada por electroforese em gel de agarose a presença do produto amplificado e realizada a sua purificação para eliminar resíduos dos reagentes

contaminantes. Para a purificação foi usado o *kit* GFX PCR DNA - Gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as instruções do fabricante, após o que se confirmou novamente a presença do fragmento por electroforese em gel de agarose.

Na segunda reacção de amplificação foram utilizados, em reacções separadas, os *primers* NL1 (*forward* - 5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL4 (*reverse* - 5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3') marcados com o fluorocromo Cy5. Preparou-se uma mistura que incluiu, por estirpe, 10 µl de DNA (produto da 1ª amplificação), 1 µl do *primer* e 11 µl de água bidestilada. Para cada estirpe foram preparados quatro tubos com 5 µl da mistura anterior. Adicionou-se então, a cada tubo, 2 µl da mistura de reacção fornecida pelo *kit* Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing (RPN 2438/RPN 2538), Amersham Pharmacia Biotech. O ciclo de PCR consistiu numa desnaturação inicial de 2 min a 95°C seguida de 26 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C e 30 s a 72°C. Ao produto amplificado foram adicionados 4 µl de *loading dye*. Em seguida, este produto foi desnaturado no termociclador durante 2 min a 92°C e foram aplicados 7 µl no gel de sequenciação.

A sequenciação foi realizada no sequenciador automático ALF Express II (Amersham, Pharmacia Biotech), seguindo as instruções do fabricante. Como referência, para os alinhamentos, foram utilizadas as sequências da mesma região das estirpes-tipo de *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* CBS 132^T e *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* CBS 6289^T depositadas no GenBank com os números AF075484 e AF075526, respectivamente. Os alinhamentos foram obtidos com o programa informático MegAlign (DNA Star) e corrigidos visualmente.

3.2.6. Análise da Variabilidade Intraspecífica

Para avaliar a variabilidade genética intraspecífica em *C. neoformans* foram utilizados os dois métodos a seguir descritos.

Polimorfismos de regiões microssatélites (MS-PCR)

A técnica de MS-PCR (*Micro/Mini Satellite primed* PCR) foi aplicada a todas as estirpes estudadas neste trabalho. A extracção do DNA e a reacção de PCR foram realizadas de forma semelhante à descrita em 3.2. Diferiram apenas os *primers* e o ciclo de PCR utilizado. Para cada estirpe foram feitas quatro reacções de amplificação, cada uma

com um dos seguintes *primers*: três microssatélites - (GACA)₄, (GTG)₅ e (GAC)₅ e um minissatélite - M13 (5' GAG GGT GGC GGT TCT 3'). O ciclo consistiu numa desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 45 s a 93°C, 60 s a 50°C e 60 s a 72°C, com uma extensão final de 6 min a 72°C. A reacção foi realizada num termociclador T Gradient Thermocycler (BIOMETRA). No controlo negativo, o DNA molde foi substituído por água destilada esterilizada. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,4% (p/v) em tampão TBE 0,5% (Tris-borato-EDTA), a 90V (Horizont 20-25, BRL) durante 3,5 h, e corados numa solução de brometo de etídio 0,5%. Em cada gel foi usado como marcador de pesos moleculares λ DNA cortado com *Hind*III e DNA de Φ x174 cortado com *Hae*III (Pharmacia, Biotech). As bandas de DNA foram visualizadas num transiluminador de UV e as imagens obtidas registadas com o Sistema Kodak Digital Science EDA 120 com o auxílio do programa informático Kodak Digital Science 1D Image Analysis.

Para manter a reprodutibilidade da técnica de MS-PCR é necessário manter constantes as variáveis mais críticas: a concentração de MgCl₂, programa da reacção e, tanto quanto possível, o termociclador. Modificações ligeiras nas condições experimentais podem repercutir-se em alterações nas intensidades das bandas.

Polimorfismos de restrição da região IGS do DNA ribossómico

Foram analisados os polimorfismos de restrição da região IGS do rDNA (Fig. 3.5) de todas as estirpes de *C. neoformans* estudadas neste trabalho. O DNA de cada isolado foi obtido seguindo a metodologia de extracção rápida para PCR. Para a reacção de PCR foram utilizados os *primers* LR12R (*forward* - 5' CTG AAC GCC TCT AAG TCA GAA 3') e NS1R (*reverse* - 5' GAG ACA AGC ATA TGA CTA C 3').

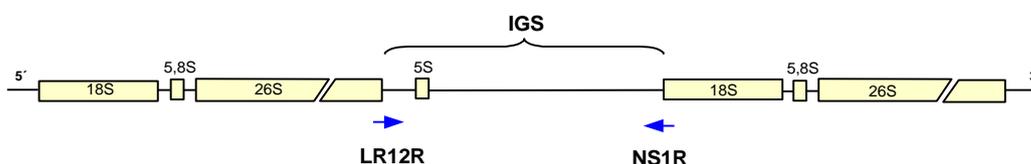


Fig. 3.5 - Locais de hibridação dos *primers* que permitem a amplificação por PCR da região IGS do rDNA.

O ciclo de PCR incluiu uma desnaturação a 94°C durante 2 min seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1,5 min a 60°C e 3 min a 72°C, com uma extensão final de 8 min a 72°C. A

reacção de amplificação foi realizada num termociclador T Gradient Thermocycler (BIOMETRA). Confirmou-se, em gel de agarose, a presença de produto amplificado. Em seguida, este foi purificado e concentrado com o *kit* GFX PCR DNA - Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as instruções do fabricante. O DNA final foi ressuspenso em água bidestilada esterilizada e guardado a -20°C .

Seguiu-se a reacção com diferentes enzimas de restrição. Foram utilizadas as enzimas *Rsal*, *AluI* e *TaqI* (Roche) que reconhecem 4 pares de bases e *ScrFI*, *DdeI* e *HinfI* que reconhecem 5 pares de bases. A mistura da reacção de restrição (volume final de 20 μl) consistiu de:

Água – 12,5 μl
Tampão da enzima – 2 μl
DNA – 5 μl
Enzima – 0,5 μl

As misturas foram incubadas à temperatura adequada para cada enzima de restrição durante a noite. A visualização dos padrões de restrição foi feita em gel de agarose convencional a 2% (p/v) em tampão TBE 0,5%. O marcador de pesos moleculares utilizado foi GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus[®] (Fermentas). A electroforese decorreu num aparelho Horizont 20-25 - BRL, a 70V durante 5 h. Após incubação numa solução de brometo de etídio 0,5%, as bandas foram observadas num transiluminador de luz UV e as imagens obtidas com o sistema Kodak Digital Science EDA 120 e digitalizadas através do programa Kodak Digital Science 1D Image Analysis.

3.2.7. Análise Numérica

Com base nas sequências da região D1/D2 do gene da subunidade 26S do RNA ribossómico, as árvores filogenéticas foram obtidas com o programa PAUP versão 4.0 (1999), utilizando o método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei 1987). As distâncias entre as sequências foram calculadas usando o modelo de dois parâmetros de Kimura (1980). A análise estatística da árvore filogenética foi realizada pelo método de *Bootstrap* (Felsenstein 1985) e baseou-se em 1000 amostras aleatórias.

Os resultados obtidos na avaliação dos polimorfismos de regiões microsatélites foram analisados por métodos de análise numérica que utilizam a combinação de dois programas informáticos: GelCompar versão 4.1 (1998) e NTSYS-pc versão 2.02h (1998). Foram

construídas matrizes originais constituídas pelas estirpes e por todas as bandas resultantes da amplificação por PCR obtidas com os quatro *primers* utilizados, sendo assinalada para cada estirpe a presença (1) ou ausência (0) de banda.

As afinidades entre as estirpes estudadas foram calculadas utilizando o coeficiente de Dice. Os coeficientes de associação, também designados por coeficientes de semelhança ou de afinidade, medem a concordância entre pares de estirpes em relação à presença de banda. O coeficiente de Dice é expresso pela equação:

$$S_D = \frac{2a}{2a+b+c} \quad (3.3)$$

em que **a** representa o número de características presentes em simultâneo nas duas estirpes, **b** o número de características presentes apenas numa das estirpes e **c** o número de características presentes apenas na outra estirpe. Com este coeficiente não é tido em consideração o número de bandas com ausência simultânea nas duas estirpes, para além de terem mais peso as presenças simultâneas do que as presenças não simultâneas (Sneath & Sokal 1973). A aplicação do coeficiente de Dice à matriz original resultou na obtenção de uma matriz de semelhança entre todas as estirpes.

Em seguida, foi aplicado à matriz de semelhança um método de agregação, do tipo sequencial, aglomerativo, hierárquico e de não-sobreposição, designado por UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*), no qual cada combinação é efectuada usando as médias aritméticas das semelhanças entre cada um dos objectos intervenientes (Sneath & Sokal 1973). A aplicação do método UPGMA à matriz de semelhanças permitiu a representação dos resultados obtidos sob a forma de dendrogramas.

Para cada dendrograma foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (*r*) entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz de semelhança. Este coeficiente de correlação cofenética exprime o grau de concordância entre estas duas matrizes e permite avaliar o grau de distorção introduzido com este método.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Identificação Molecular de Isolados Clínicos de *Cryptococcus neoformans*

Utilização de um *primer* específico

O conhecimento das sequências da região D1/D2 do gene do rRNA 26S para um grande número de leveduras conduziu à identificação de zonas mais variáveis que permitiram diferenciar as diferentes espécies. Fell (1995), com o objectivo de distinguir leveduras patogénicas, foi o primeiro a utilizar essa variabilidade para desenhar oligonucleótidos que pudessem funcionar como *primers* específicos em reacções de PCR.

No entanto Fell tinha apenas testado a aplicabilidade do método à estirpe-tipo de *C. neoformans*, pelo que pretendemos avaliar a sua utilidade para uma identificação fiável de isolados desta espécie. Por outro lado, utilizámos para controlo outras espécies de interesse médico também isoladas de amostras clínicas, o que permitiu verificar a especificidade para *C. neoformans*.

O método compreendia a utilização de três *primers*: dois universais, em regiões conservadas, e um *primer* específico para *C. neoformans* localizado no interior do fragmento amplificado pelos outros dois. Num total de 51 isolados de *C. neoformans* seleccionados para este trabalho, incluindo tanto estirpes da var. *neoformans* como da var. *gattii*, observou-se a formação de duas bandas para 49 dessas estirpes. Conforme o esperado, uma das bandas tinha cerca de 600 pb e a outra, específica para a espécie em estudo, ~200 pb (Fig. 3.6). Dois dos isolados, CN 15 e CN 71, constituíram excepção a esta regra, pois apresentaram apenas uma banda com ~600 pb (Fig. 3.6).

Com os 21 isolados clínicos de outras espécies de leveduras (Tabela 3.2), nunca houve amplificação do fragmento específico com ~200 pb. Com todos esses isolados apareceu unicamente um produto de amplificação com o tamanho correspondente a ~600 pb

(Fig. 3.6). A ausência do fragmento de ~200 pb nestes casos indica que o *primer* utilizado é realmente específico para *C. neoformans*.

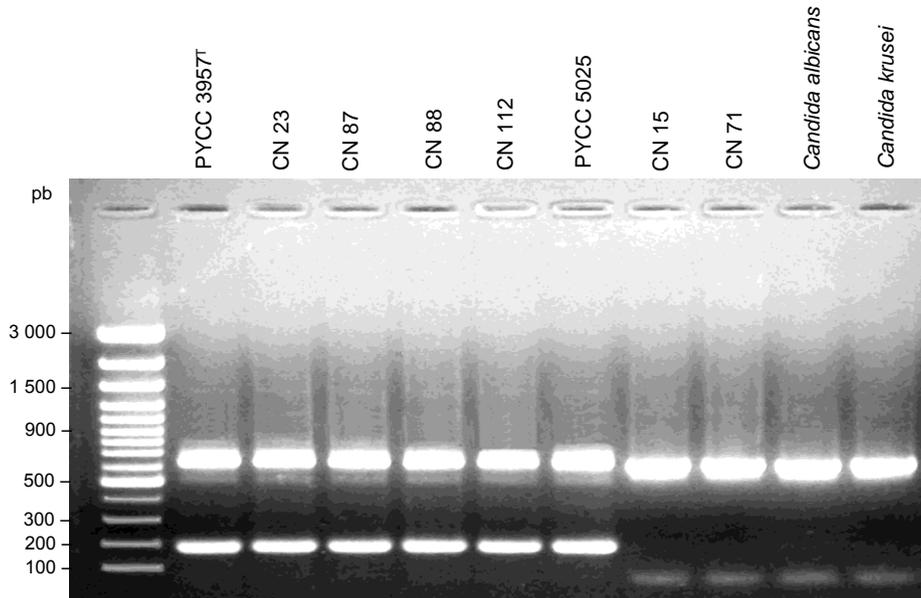


Fig. 3.6 - Separação electroforética em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR obtidos a partir do DNA de isolados de *Cryptococcus neoformans* utilizando três *primers*: dois universais que delimitam a região D1/D2 do rDNA e um específico para *C. neoformans*. Isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida krusei* foram usados como controlo negativo.

Os resultados obtidos com as estirpes CN 15 e CN 71, anteriormente identificadas através dos testes API como pertencendo à espécie *C. neoformans*, sugeriram estarmos perante identificações incorrectas. Foi necessário, portanto, confirmar a identidade destes isolados através da aplicação de outras técnicas moleculares.

Em resumo, a metodologia utilizada é muito simples e rápida, depois de optimizadas as condições de PCR, e potencialmente muito interessante para ser aplicada num procedimento de rotina em laboratórios de microbiologia clínica.

Validação do método utilizado

Para verificar a ausência de conspecificidade dos isolados CN 15 e CN 71 com *C. neoformans* foi, primeiro, determinada a composição do DNA nuclear. Nesta parte do trabalho foram também incluídas outras estirpes que revelaram diferenças em testes fisiológicos, em relação ao padrão médio de todas as estirpes estudadas, nomeadamente em relação à temperatura máxima de crescimento.

A composição em bases do DNA (% mol G+C) foi determinada, neste trabalho, por desnaturação térmica (Marmur & Doty 1962). Como a eficácia deste método pode ser muito afectada pela presença de impurezas na amostra do DNA e/ou pela presença de DNA muito fragmentado, foi necessária uma extracção de DNA mais cuidadosa do que a utilizada para as reacções de PCR (Britten *et al.* 1970).

O ponto de inflexão da curva de desnaturação térmica (T_m) é o parâmetro a determinar para o cálculo do conteúdo em GC. Na Fig. 3.7 apresenta-se uma curva típica de desnaturação térmica do DNA total de estirpes de *C. neoformans*. O valor de T_m é automaticamente obtido através do pico máximo da 1ª derivada da curva de desnaturação. Por vezes aparece um pequeno pico a temperaturas mais baixas (menor % GC) que corresponde à presença, na solução analisada, de DNA mitocondrial.

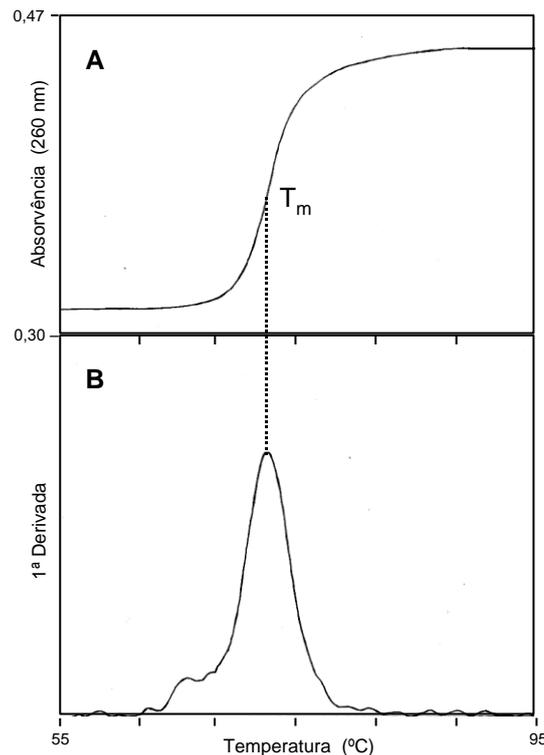


Fig. 3.7 - Curva de desnaturação térmica do DNA da estirpe PYCC 3957^T para a determinação da % mol G+C (A) e 1ª derivada correspondente (B). T_m - temperatura de desnaturação do DNA.

Os valores do conteúdo em GC do DNA das 14 estirpes estudadas encontram-se listados na Tabela 3.3. Verifica-se que variaram entre 48,8% e 51,1% excepto para o isolado

CN 15 em que o valor foi muito inferior (33,5%). Esta diferença no conteúdo em GC (aproximadamente 16,5%) constitui uma indicação nítida de ausência de conspecificidade com as restantes estirpes em estudo.

Tabela 3.3 - Valores de T_m , composição do DNA e grau de complementaridade genómica das estirpes analisadas com a estirpe-tipo de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (PYCC 3957^T) e com *C. neoformans* var. *gattii* (PYCC 5026).

Estirpe	T_m (°C)	% mol G+C	Reassociação DNA/DNA (%)	
			x PYCC 3957 ^T	x PYCC 5026
CN 2	72,8	51,1	100	–
CN 15	66,4	33,5	–	–
CN 48	72,6	48,9	98	–
CN 71	73,1	49,7	24	–
CN 73	72,8	48,9	100	–
CN 77	72,9	48,8	97	–
CN 80	72,1	49,6	94	–
CN 95	73,5	49,9	99	–
CN 112	72,6	50,2	60-98	–
PYCC 3957 ^T	72,5	49,3	100	29
PYCC 5025	73,4	50,2	28	–
PYCC 5026	72,8	48,8	29	–
PYCC 5027	71,9	50,2	28	–
PYCC 5028	73,2	49,7	33	82

Como já foi referido, o conteúdo em GC das leveduras ascomicetas oscila entre os 27-50%, enquanto que o dos basidiomicetas varia entre os 50-70% (Kurtzman & Fell 1998). Assim, o baixo valor do conteúdo em GC obtido para o isolado CN 15 sugere tratar-se de um ascomiceta. Outros métodos terão de ser empregues para a re-identificação desta estirpe.

Considerando todos os isolados para os quais se obteve o fragmento de 200 pb com o *primer* específico de *C. neoformans*, a variação dos valores da % mol G+C foi de 2,3% (48,8%-51,1%). Estes valores (Tabela 3.4) são ligeiramente superiores aos obtidos por Erke e Schneidau (1973), aproximadamente semelhantes aos de Nakase e Komagata (1971) e inferiores aos de Aulakh *et al.* (1981). Estas diferenças no conteúdo em GC podem atribuir-se a vários factores, nomeadamente à utilização de metodologias diferentes para a sua determinação (Storck *et al.* 1969).

Como já foi salientado anteriormente, a composição do DNA apenas informa pela negativa, i.e. estirpes da mesma espécie têm um conteúdo em GC idêntico, mas duas

Tabela 3.4 - Comparação entre os valores da % mol G+C obtidos neste trabalho e os referidos por outros autores.

Autores	% mol G+C
Aulakh <i>et al.</i> 1981	53,4 - 57,8
Erke & Schneidau 1973	43,0 - 45,9
Nakase & Komagata 1971	49,0 - 49,8
Este trabalho	48,8 - 51,1

estirpes com o mesmo teor em GC podem pertencer a espécies diferentes. Assim, o facto do valor da % mol G+C obtido para a estirpe CN 71 ser semelhante aos determinados para a grande maioria das estirpes de *C. neoformans* estudadas não exclui que tenha havido uma identificação incorrecta. Foi preciso, portanto, proceder a experiências de reassociação DNA-DNA. Por outro lado, tornou-se logo evidente que CN 15 não representava *C. neoformans* pelo que não seria necessário incluir este isolado nos ensaios.

Na Tabela 3.3 apresentam-se os valores do grau de complementaridade genómica obtidos nessas experiências de reassociação, calculados (ver equação 3.2) a partir da cinética de renaturação do DNA de estirpes isoladas ou em mistura (Fig. 3.8). Como referências foram utilizadas a estirpe-tipo de *C. neoformans* (PYCC 3957^T) e uma estirpe de *C. neoformans* var. *gattii* (PYCC 5028).

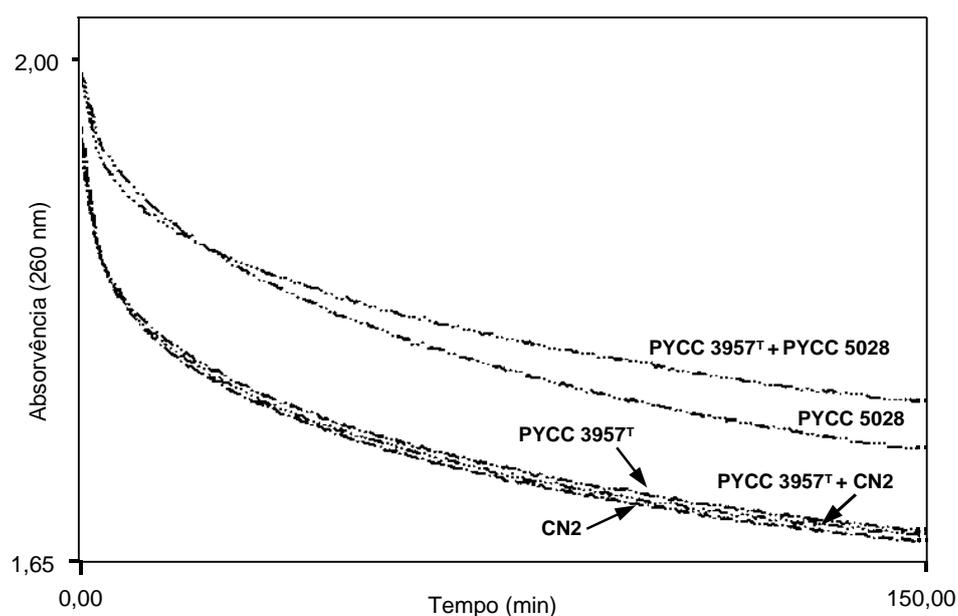


Fig. 3.8 - Curvas de renaturação dos DNAs das estirpes CN2, PYCC 3957^T, PYCC 5028 e respectivas misturas, a 57°C, após desnaturação térmica.

Seis das estirpes adicionais analisadas por este método (CN 2, CN 48, CN 73, CN 77, CN 80 e CN 95) mostraram um grau de complementaridade genómica elevado em relação à estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *neoformans* (94-100%), o que demonstra serem estirpes da mesma espécie. Contrariamente, as estirpes de *C. neoformans* var. *gattii* PYCC 5025, PYCC 5026, PYCC 5027 e PYCC 5028 evidenciaram um baixo grau de homologia genómica com a estirpe-tipo da var. *neoformans* (28-33%) indicador de ausência de conspecificidade. A reassociação entre os DNAs de duas das estirpes de *C. neoformans* var. *gattii* (PYCC 5026 e PYCC 5028) revelou, pelo contrário, um elevado índice de conspecificidade (82%).

A estirpe CN 112, sendo excepcionalmente mucosa, trouxe inúmeras dificuldades na extracção e purificação do DNA e é provável que não tenha sido conseguido o grau de pureza e integridade ideais para as experiências de reassociação. Das várias tentativas efectuadas resultaram valores de reassociação DNA-DNA muito variáveis (de 60 a 98%). Esta falta de reprodutibilidade deverá estar associada à qualidade da preparação do DNA, nomeadamente à presença de uma maior ou menor quantidade de polissacáridos da cápsula.

Através das experiências de reassociação confirmou-se que a estirpe CN 71 não correspondia a *C. neoformans* pois o grau de homologia com a estirpe-tipo desta espécie é muito baixo (24%).

Sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S

Obtida a informação de que tanto CN 15 como CN 71 tinham sido incorrectamente identificados através dos testes fenotípicos convencionais, foi decidido sequenciar a região D1/D2 do gene do rRNA 26S porque as bases de dados com acesso público permitem já a identificação da grande maioria das leveduras descritas através das sequências desse fragmento. Esta sequenciação foi ainda alargada a outras estirpes de *C. neoformans* que revelaram diferenças fenotípicas e/ou genotípicas significativas em relação às restantes.

A comparação das sequências obtidas com as sequências acessíveis no GenBank conduziu a vários resultados interessantes. Confirmou-se que o isolado CN 15 representava um ascomiceta, pois o alinhamento das sequências mostrou uma homologia de 100% com a sequência do ascomiceta *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* CBS 767^T. Através do

alinhamento de sequências verificou-se também que a sequência da estirpe CN 71 era idêntica à de *Cryptococcus albidus* CBS 142.

Relativamente às outras estirpes analisadas (Fig. 3.9), as sequências obtidas para CN 54, CN 73, CN 77, CN 80 e PYCC 5028 mostraram ser 100% idênticas à da estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *neoformans* (*Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* CBS 132^T) e as sequências das estirpes PYCC 5026 e PYCC 5027 idênticas à da estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *gattii* (*Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* CBS 6289^T). De notar que a sequência da região D1/D2 desta variedade difere em apenas uma base da sequência homóloga da variedade *neoformans*. É curioso que a estirpe PYCC 5028 exibiu maior homologia com a var. *neoformans* do que com a var. *gattii*, embora uma série de outras características (incluindo o grau de complementaridade DNA-DNA) apontem para o contrário.

CBS 132 ^T	396	CCA GTT CTG	460	GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
CN 54		CCA GTT CTG		GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
CN 73		CCA GTT CTG		GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
CN 77		CCA GTT CTG		GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
CN 80		CCA GTT CTG		GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
PYCC 5028		CCA GTT CTG		GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
CBS 6289 ^T		CCA GCT CTG		GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
PYCC 5026		CCA GCT CTG		GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
PYCC 5027		CCA GCT CTG		GGA GGA ATG TGG CAC TCT TCG GGG TGT
CN 112		CCA GTT CTG		GGG GGA ATG TAG CAC TCT TCG GAG TGT
PYCC 5025		CCA GTT CTG		GGG GGA ATG TAG CAC TCT TCG GAG TGT

Fig. 3.9 - Sequências de um fragmento da região D1/D2 do gene de rRNA 26S de isolados de *Cryptococcus neoformans*, em comparação com as sequências das estirpes tipo da var. *neoformans* (CBS 132^T) e da var. *gattii* (CBS 6289^T) que se encontram depositadas no GenBank. Estão ainda assinaladas a vermelho as diferenças em relação à sequência da estirpe-tipo da var. *neoformans*.

Em relação às sequências obtidas para duas das estirpes estudadas, CN 112 e PYCC 5025 (Fig. 3.9), observou-se uma diferença de três bases (~0,5%) quando comparadas com a sequência da estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *neoformans* e uma diferença de quatro bases em relação à estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *gattii* (~0,6%). Como tem sido sugerido que entre isolados da mesma espécie se pode verificar um polimorfismo da ordem dos 1,0-5,1% sem perda de conspecificidade (Peterson & Kurtzman 1991), estas variações

são consideradas insuficientes para justificar uma separação ao nível da espécie. Vale a pena sublinhar que uma das estirpes está classificada na var. *neoformans* (CN 112) e a outra aparenta pertencer à var. *gattii* (PYCC 5025).

Fan *et al.* (1994) estudaram 12 estirpes de *C. neoformans* (6 estirpes da var. *neoformans* e 6 da var. *gattii*) e verificaram também que as sequências nucleotídicas dos genes do RNA ribossômico das duas variedades eram extraordinariamente semelhantes. Em 5656 bases sequenciadas na unidade do rDNA, detectaram 99% de semelhança entre as duas variedades.

A análise das sequências da região D1/D2 obtidas neste trabalho para as diferentes estirpes estudadas permite-nos fazer as seguintes observações:

(i) Esta região do rDNA permite diferenciar estirpes pertencentes a espécies diferentes, tais como CN 71 e CN15;

(ii) A sequenciação desta região menos conservada agrupa as estirpes que pertencem a uma mesma espécie. Todos os isolados já certificados como *C. neoformans* foram confirmados na sua identificação;

(iii) A região D1/D2 do rDNA 26S não parece adequada para distinguir espécies muito próximas ou variedades de uma mesma espécie:

- PYCC 5028 é uma estirpe de *C. neoformans* var. *gattii* e tem uma sequência idêntica à da estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *neoformans* (CBS 132^T).
- As estirpes PYCC 5025 (*C. neoformans* var. *gattii*) e CN 112 (*C. neoformans* var. *neoformans*) têm as mesmas 3 bases de diferença em relação à sequência da estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *neoformans* e 4 bases de diferença em relação à estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *gattii*.
- A única base de diferença entre as sequências das duas variedades de *C. neoformans* é manifestamente insuficiente para as distinguir, observação que está de acordo com a de outros autores (Peterson & Kurtzman 1991).

3.3.2. Variabilidade Intraspecífica

Polimorfismos de regiões microssatélites (MS-PCR)

Na sequência da identificação molecular dos isolados clínicos em estudo, quisemos avaliar a capacidade de alguns métodos actualmente utilizados na caracterização taxonómica de microrganismos para diferenciar estirpes de uma mesma espécie. A técnica de MS-PCR, que permite determinar os polimorfismos de regiões micro- e minissatélites frequentemente repetidas no genoma, foi aplicada a todas as estirpes de *C. neoformans* incluídas neste trabalho. Os perfis electroforéticos dos produtos de amplificação obtidos com cada um dos quatro *primers* – M13, (GTG)₅, (GAC)₅ e (GACA)₄ – permitiram agrupar as estirpes em função das semelhanças observadas. Esses grupos não variaram significativamente com o *primer*, embora com (GTG)₅ e (GAC)₅ se tenham obtido perfis mais homogéneos. Na Fig. 3.10 estão representados os perfis obtidos com o *primer* (GACA)₄.

A Fig. 3.11 apresenta um dendrograma resultante da análise numérica dos resultados obtidos para o conjunto de três dos *primers* utilizados. Como se pode observar, as estirpes de *C. neoformans* var. *neoformans* ficaram divididas em dois grupos e as de *C. neoformans* var. *gattii* num grupo à parte, bem diferenciado dos dois primeiros. Os dois grupos formados pelas estirpes de *C. neoformans* var. *neoformans* mostraram uma correlação directa com os serotipos: no grupo I ficaram agrupadas somente estirpes do serotipo A, enquanto no grupo II ficaram as estirpes do serotipo D, AD e quatro estirpes do serotipo A (CN 2, CN 65, CN 119 e PYCC 3529). Este agrupamento sugere uma relação muito próxima entre as estirpes do serotipo A e D e poderá incluir estirpes híbridas, resultantes de reprodução (para)sexuada (Boekhout *et al.* 2001). Os isolados de *C. neoformans* var. *gattii*, por outro lado, diferenciaram-se nitidamente da var. *neoformans*, embora dentro do próprio grupo os perfis apresentassem diferenças. O perfil obtido com a estirpe PYCC 5028 é claramente distinto dos perfis das outras estirpes da mesma variedade.

O isolado CN 71, agora já identificado como *C. albidus*, foi igualmente incluído neste estudo como *outgroup*, tendo ficado nitidamente separado dos agrupamentos de *C. neoformans*.

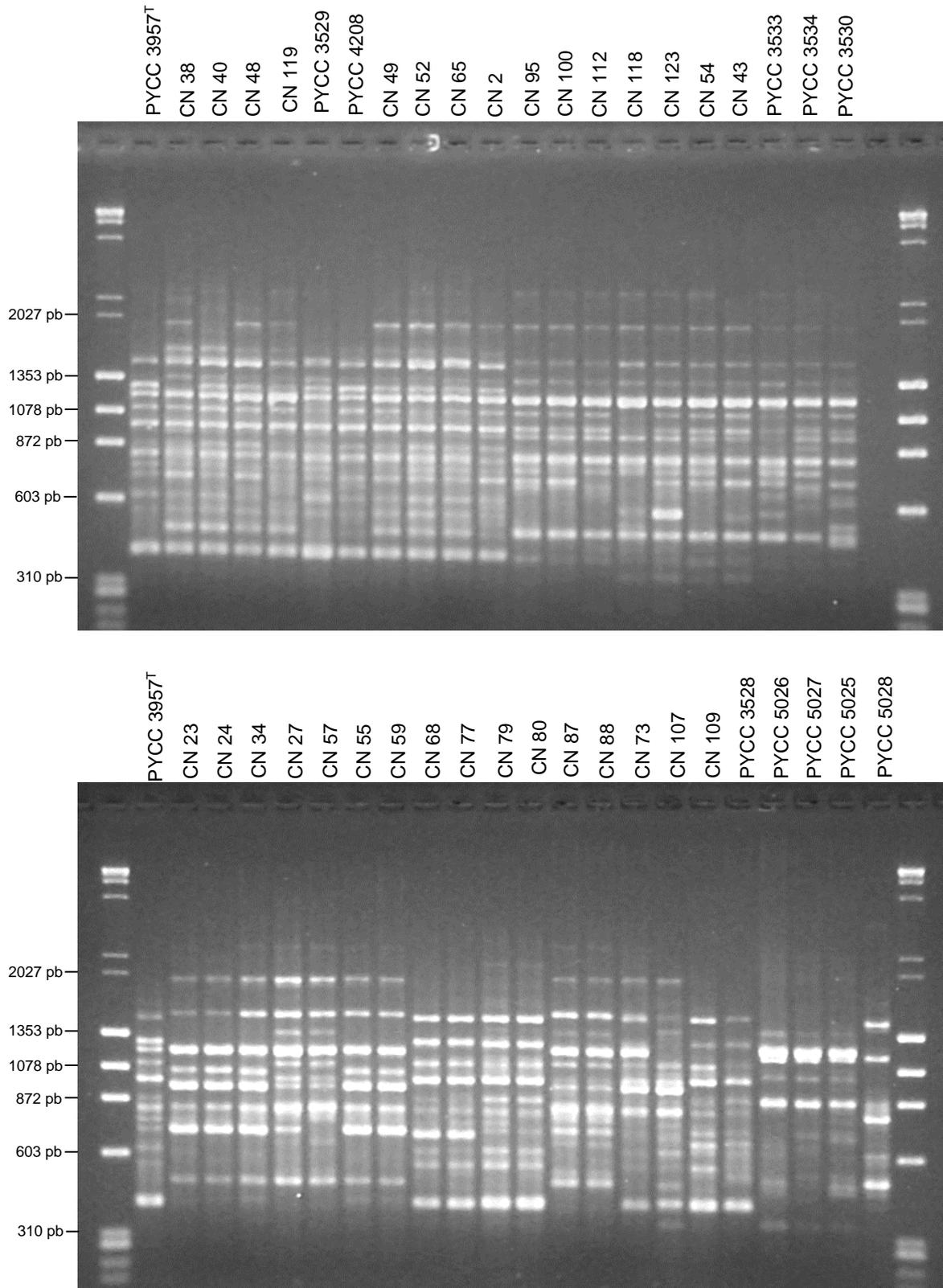


Fig. 3.10 - Padrões electroforéticos dos produtos de amplificação obtidos com o *primer* microsatélite (GACA)₄ a partir do DNA das estirpes de *Cryptococcus neoformans* utilizadas neste estudo.

Não observámos qualquer relação entre a origem dos isolados, ambiental ou clínica, e a semelhança entre perfis electroforéticos, embora a amostra não seja significativa. Já em relação ao produto biológico, vale a pena salientar que todos os isolados da pele se encontram no mesmo grupo II. A existência de padrões quase idênticos entre as estirpes ambientais e clínicas está de acordo com a possibilidade dos doentes serem infectados por estirpes provenientes do ambiente e parece indicar que os factores do hospedeiro não determinam alterações notórias nos polimorfismos das regiões microssatélite. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Currie *et al.* (1994) no estudo de 25 estirpes clínicas e ambientais de *C. neoformans* var. *neoformans* isoladas de uma região geográfica relativamente restrita.

A análise mais pormenorizada dos padrões obtidos em cada grupo, nomeadamente com os *primers* (GACA)₄ e M13, permitiu-nos detectar uma variabilidade intraspecífica apreciável. Entre as diferentes estirpes de cada grupo foram observadas ligeiras diferenças, mas bem visíveis, relativamente à presença ou ausência de algumas bandas e à intensidade das mesmas e estas variações permitem, aparentemente, distinguir diferentes isolados. Por outro lado, a semelhança entre perfis de bandas permite identificar com nitidez as estirpes isoladas a partir do mesmo doente, tanto a partir de produtos biológicos diferentes no mesmo momento da infecção (Fig. 3.10, CN 38/CN 40, CN 49/CN 52, CN 87/CN 88) como as isoladas em alturas diferentes no decurso de uma infecção recidivante (Fig. 3.12). No entanto, também há estirpes de diferentes proveniências que exibem padrões indistinguíveis com os *primers* M13, (GTG)₅ e (GAC)₅, como por exemplo CN 55 e CN 59. Resta saber a história destes doentes que poderá não excluir que se trate da mesma estirpe.

Foi também só o *primer* (GACA)₄, anteriormente referido por outros autores (Garcia-Hermoso *et al.* 1997) como tendo um elevado poder discriminatório, que permitiu distinguir as estirpes entre si: CN 40 (isolada de uma infecção contemporânea) e CN 48 (isolada de uma infecção de há mais de 20 anos) ou os isolados CN 54 (isolado clínico) e PYCC 3530 (isolado ambiental).

A observação de perfis de bandas idênticos em isolados sucessivos do mesmo doente (Fig. 3.12) constitui uma forte indicação de que a infecção criptocócica recorrente resultou sempre de uma recidiva e não da introdução de novas estirpes. Este método apresenta um enorme potencial para ser aplicado na monitorização de isolados clínicos em estudos de epidemiologia molecular e no estudo da patogénese de infecções recorrentes em doentes imunodeprimidos. Pode ser ainda uma ferramenta muito útil para

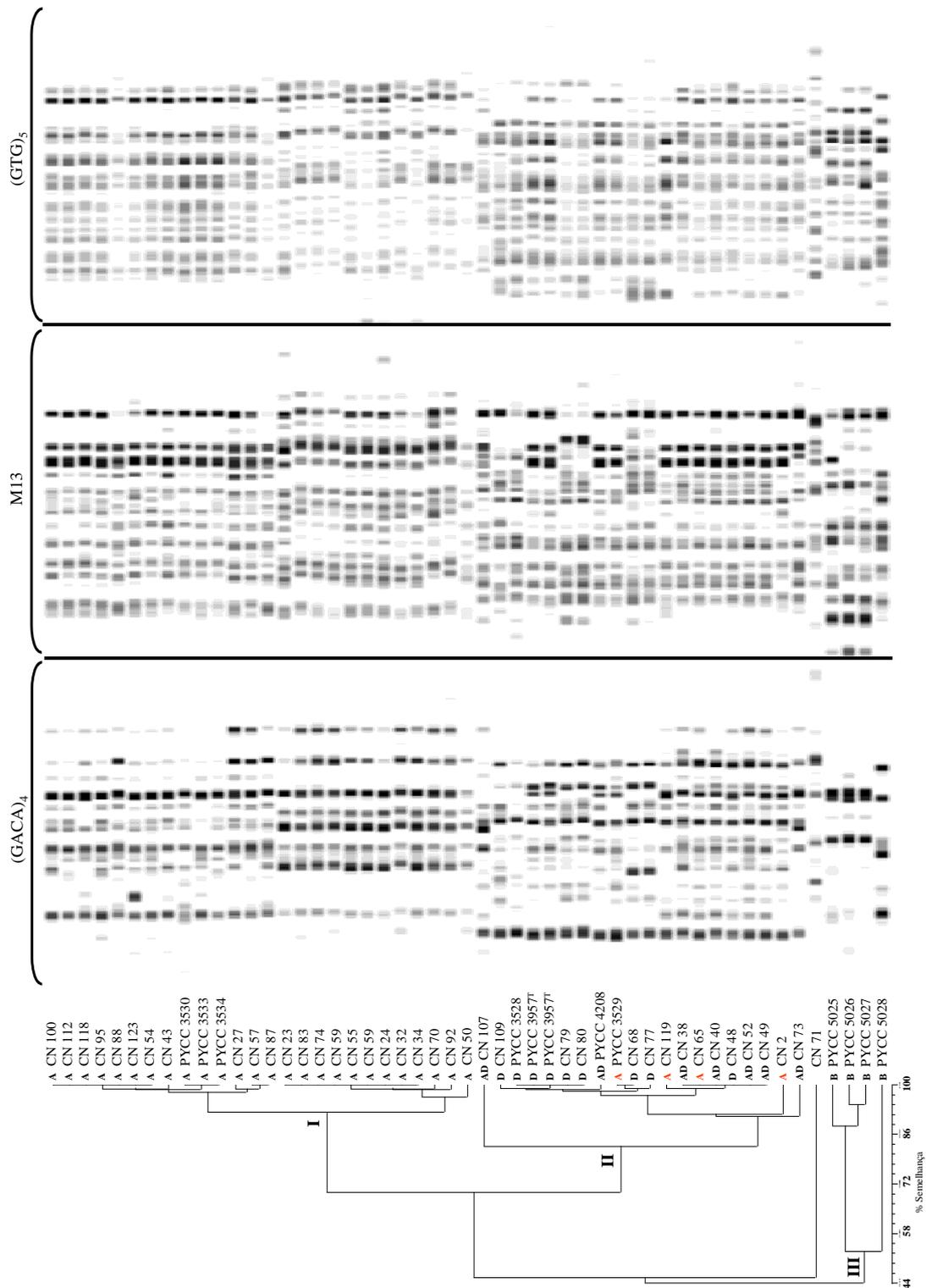


Fig. 3.11 - Dendrograma representando a semelhança entre todas as estirpes de *Cryptococcus neoformans* estudadas neste trabalho com base nos perfis electroforéticos obtidos com os *primers* (GACA)₄, M13 e (GTG)₅, utilizando o coeficiente de DICE e o método aglomerativo UPGMA (coeficiente de correlação cofenética, $r=0,99$). A estirpe CN 71 (*C. albidus*) foi utilizada como *outgroup*. As estirpes de *C. neoformans* var. *neoformans* repartem-se por dois grupos (I e II) e as da var. *gattii* formam um grupo distinto (III). Está ainda indicado, junto de cada estirpe, o respectivo serotipo.

avaliar a disseminação de estirpes resistentes aos antibióticos antifúngicos e/ou aos esquemas terapêuticos (Spitzer & Spitzer 1992).

Segundo Fries *et al.* (1999), o padrão electroforético de produtos de amplificação para os mesmos isolados clínicos ou ambientais de *C. neoformans* revelam-se mais estáveis quando as estirpes são mantidas *in vitro* e geneticamente mais polimórficos quando as leveduras são sujeitas a fortes condições de *stress* como as verificadas em situação de parasitismo, apesar da instabilidade genotípica ser mais acentuada numa estirpe do que noutras. É possível que seja esta a justificação para alguma variabilidade nos perfis de estirpes provenientes de infecções recorrentes, como a que se observa com a estirpe CN 50 em relação aos restantes isolados do mesmo doente (Fig. 3.12).

Estas alterações rápidas foram igualmente observadas ao nível de sequências mais longas do DNA cromossómico (Franzot *et al.* 1998b, Sullivan *et al.* 1996). Em estudos que utilizam métodos de genotipagem muito sensíveis, como o MS-PCR, deve ter-se em conta a possibilidade de ocorrência de microevolução quando o microrganismo é sujeito a condições de stress, tanto ambientais como parasitárias. Por exemplo, observou-se microevolução em

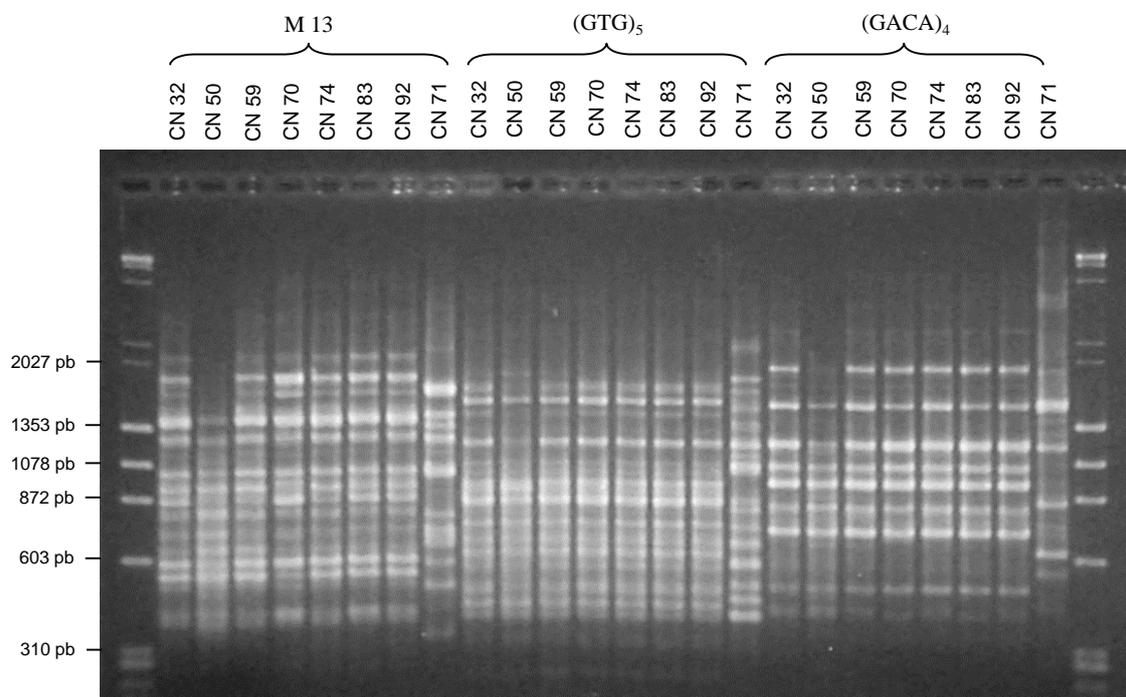


Fig. 3.12 - Padrões electroforéticos dos produtos de amplificação obtidos com os *primers* M13, (GTG)₅ e (GACA)₄, a partir do DNA genómico de sete estirpes de *Cryptococcus neoformans* isoladas de infecções recidivantes do mesmo doente. A estirpe CN 71 (*Cryptococcus albidus*) foi isolada do LCR do mesmo doente e utilizada como referência.

estirpes conservadas *in vitro* e demonstrou-se que essa variação estava associada a diferentes condições de manutenção das culturas (Franzot *et al.* 1998b). Gottfredson *et al.* (1998) descreveram também alterações nos perfis de uma mesma estirpe isolada várias vezes a partir do LCR de um doente com meningite recorrente. Essas variações foram também atribuídas a uma microevolução rápida. Por outro lado, Haynes *et al.* (1995a) observaram, por MS-PCR, que num doente tinha havido reinfecção por *C. neoformans* por uma estirpe diferente da que tinha sido isolada na primeira infecção. Segundo os autores, as diferenças entre os padrões obtidos para as duas estirpes eram suficientemente acentuadas para excluir ter havido microevolução.

Consequentemente, a interpretação comparativa de polimorfismos de regiões microssatélites em estirpes provenientes de um mesmo doente deverá ser feita com precaução a fim de avaliar as alternativas de microevolução de uma mesma estirpe ou infecção por estirpes diferentes.

Polimorfismos de restrição de regiões variáveis do DNA ribossômico

O estudo dos polimorfismos da região IGS do rDNA (ver Fig. 3.1) de *C. neoformans* teve como objectivo avaliar a diversidade genética existente entre as estirpes desta espécie. A região IGS do rDNA, desde a extremidade 5' do rDNA 26S de cada unidade de rDNA até à extremidade 3' do rDNA 18S da unidade adjacente, foi amplificada por PCR. Os fragmentos amplificados confirmaram dados de outros autores sobre a existência de polimorfismos em relação ao comprimento. Pelos nossos resultados, o comprimento desta região variou entre 2,7 e 3,0 kb (Fig. 3.13).

Na Fig. 3.14 estão representados os perfis de restrição dos IGS das diferentes estirpes de *C. neoformans* obtidos com as enzimas *RsaI* e *AluI*. Apesar dos padrões electroforéticos dos produtos de restrição terem sido diferentes para cada enzima, os grupos formados e as estirpes incluídas em cada grupo foram idênticos para ambas as enzimas (Tabela 3.5).

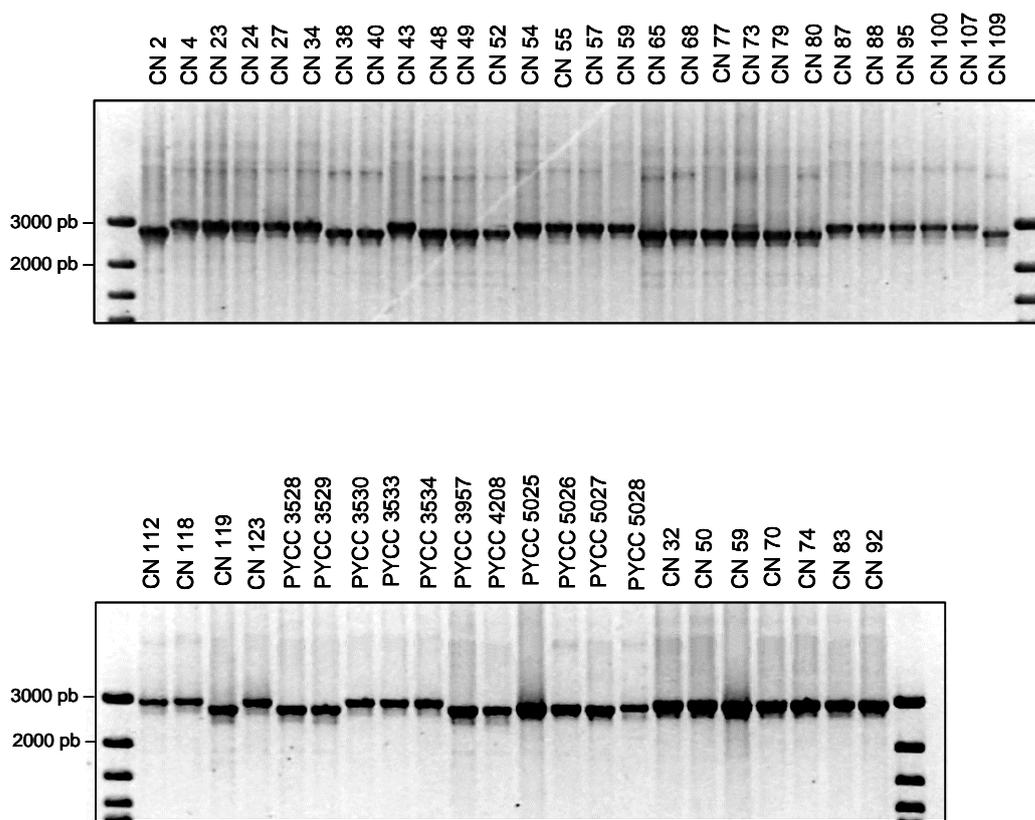


Fig. 3.13 - Polimorfismos de comprimento da região IGS do rDNA das estirpes de *Cryptococcus neoformans* estudadas neste trabalho.

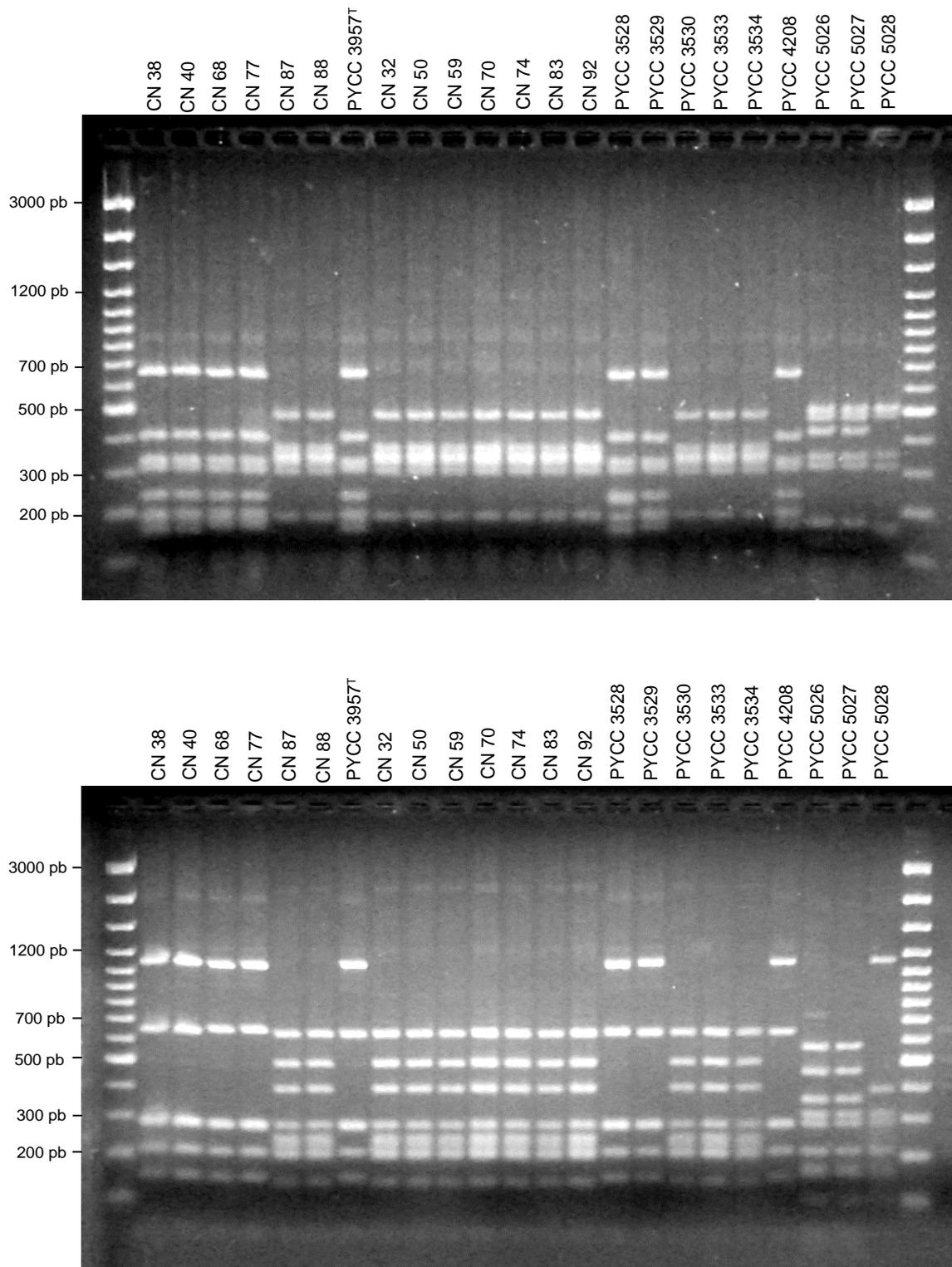


Fig. 3.14 - Perfis de restrição da região IGS do rDNA de *Cryptococcus neoformans* amplificada por PCR utilizando as enzimas *AluI* (superior) e *RsaI* (inferior).

Tabela 3.5 - Padrões dos polimorfismos de restrição da região IGS do rDNA evidenciados pelas estirpes de *Cryptococcus neoformans* estudadas neste trabalho.

Padrão	Estirpes			
1	CN 4	CN 70	CN 55	CN 112
	CN 23	CN 74	CN 57	CN 118
	CN 24	CN 83	CN 87	CN 123
	CN 27	CN 92	CN 88	PYCC 3530
	CN 32	CN 34	CN 95	PYCC 3533
	CN 50	CN 43	CN 100	PYCC 3534
	CN 59	CN 54	CN 107	
2	CN 2	CN 52	CN 79	PYCC 3529
	CN 38	CN 65	CN 80	PYCC 3957 ^T
	CN 40	CN 68	CN 109	PYCC 4208
	CN 48	CN 77	CN 119	
	CN 49	CN 73	PYCC 3528	
3	PYCC 5025	PYCC 5026	PYCC 5027	
4	PYCC 5028			

No conjunto de estirpes de *C. neoformans* var. *neoformans* formaram-se dois grupos (1 e 2), ambos homogêneos mas perfeitamente distintos um do outro (Fig.3.13). Para os isolados de *C. neoformans* var. *gattii* obtiveram-se também dois grupos (3 e 4), tendo a estirpe PYCC 5028 surgido mais uma vez com um padrão diferente do das outras estirpes da mesma variedade. Em relação à frequência de ocorrência de cada padrão no conjunto das estirpes de *C. neoformans* var. *neoformans* analisadas, o padrão 1 foi o predominante (61%).

Tal como para os polimorfismos das regiões microssatélites, observa-se uma correlação entre os serotipos de *C. neoformans* var. *neoformans* e os padrões obtidos. As estirpes do serotipo A integram-se, na maioria dos casos, no padrão 1 (55%). As estirpes CN 2, CN 65, CN 119 e PYCC 3529 são de serotipo A, mas tiveram perfis do padrão 2. Coincidência, ou talvez não, estas são exactamente as mesmas estirpes que ficaram separadas do agrupamento das estirpes com serotipo A baseado nos perfis de MS-PCR. As estirpes do serotipo D e AD constituíram, na quase totalidade dos casos, outro grupo distinto (perfis do padrão 2). Somente o isolado CN 107 (serotipo AD) apresentou um perfil do padrão 1.

A ausência de correlação entre os perfis de restrição obtidos e a origem das estirpes não contraria, mais uma vez, a forte probabilidade das infecções poderem ser contraídas a partir de estirpes ambientais ou, por outras palavras, das estirpes saprófitas serem

potenciais agentes infecciosos, podendo causar infecção caso consigam vencer as barreiras imunológicas e disseminar-se no organismo hospedeiro.

Relativamente à variabilidade nos grupos de *C. neoformans* var. *neoformans*, esta técnica revelou-se pouco sensível na avaliação da diversidade genética entre isolados. Todavia, os polimorfismos da região IGS têm sido utilizados por diferentes autores como uma ferramenta molecular muito útil, sensível, rápida e de fácil aplicação na diferenciação ao nível de estirpe em diferentes géneros de bactérias e leveduras (Diaz & Fell 2000, Diaz *et al.* 2000, Fell & Blatt 1999, Polacheck *et al.* 1992, Vannechoutte *et al.* 1992).

Apesar dos polimorfismos observados no comprimento da região IGS das diferentes estirpes de *C. neoformans* (Fig. 3.12), e como seria de esperar, as estirpes de um mesmo grupo definido pelos perfis de restrição apresentam um IGS de igual tamanho. No entanto, tal poderia não ter acontecido devido ao número muito reduzido de enzimas de restrição utilizadas.

Casadevall *et al.* (1992a) estudaram o polimorfismo do *locus* do gene para a oroditina monofosfato pirofosforilase (OMPPase) em *C. neoformans*, utilizando enzimas de restrição, e observaram uma grande diversidade genómica entre os isolados clínicos obtidos numa dada área geográfica. Os polimorfismos de restrição do *locus* OMPPase contrastam com a ausência de variabilidade dos padrões RFLP para os genes no rDNA, utilizando a mesma técnica (Vilgalys & Hester 1990). Parece consensual que, devido ao elevado grau de conservação do rDNA, a aplicação de enzimas de restrição não permite diferenciar estirpes, mas apenas espécies ou, eventualmente, subespécies (Vannechoutte *et al.* 1992).

CAPÍTULO 4

DETECÇÃO DIRECTA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* EM AMOSTRAS CLÍNICAS

4.1. INTRODUÇÃO

Ao longo das duas últimas décadas tem-se verificado um aumento significativo da incidência das infecções fúngicas sistémicas. Isso deve-se, por um lado, ao crescimento do número de doentes imunodeprimidos e, por outro, aos avanços na medicina que utiliza terapêuticas cada vez mais agressivas e práticas clínicas mais invasivas. Os fungos, que durante muitos anos foram considerados como não tendo potencial patogénico apreciável, ocorrem actualmente de forma preocupante num número muito diversificado de situações patológicas. As infecções fúngicas oportunistas invasivas, entre as quais se conta a criptococose, são hoje importantes causas de morbilidade e mortalidade, principalmente em doentes debilitados e com baixa imunidade. Os métodos actuais de diagnóstico baseados na cultura pura apresentam várias desvantagens, entre as quais se destaca a morosidade (Wahyuningsih *et al.* 2000). Em situações de risco, a detecção imediata do agente etiológico permitirá um pronto início da terapêutica antifúngica com conseqüente redução da morbilidade e aumento de sobrevida do doente (Posteraro *et al.* 2000).

Como resposta ao número crescente de infecções por leveduras patogénico-oportunistas, tem havido um esforço simultâneo para melhorar os métodos de diagnóstico micológico no sentido de os tornar não só mais rápidos mas também mais sensíveis e específicos. A aplicação de uma grande variedade de métodos moleculares em taxonomia microbiana tem estimulado a adaptação de metodologias para a identificação específica de agentes patogénicos directamente a partir de amostras clínicas. Devido à sua elevada especificidade e sensibilidade, esses novos protocolos tornaram possível, em Microbiologia Clínica, a detecção de um número cada vez maior de microrganismos, incluindo aqueles de crescimento muito lento, como as micobacérias, ou difíceis de cultivar, como os micoplasmas.

4.1.1. Métodos de Detecção Directa Baseados em PCR

Devido à capacidade de detectar quantidades diminutas de DNA, os métodos baseados na técnica de PCR possuem um enorme potencial na detecção de microrganismos patogénicos (Gottfredsson *et al.* 1998).

A maior parte destas metodologias utilizou, como molde nas reacções de PCR, DNA de culturas puras de *Cryptococcus neoformans*. A detecção desta levedura directamente a partir de produtos biológicos infectados tem sido, no entanto, menos estudada. Tanaka *et al.* (1996) identificaram *C. neoformans* a partir de amostras clínicas de doentes com criptococose pulmonar através de um método envolvendo duas reacções de PCR sucessivas (*nested* PCR) que permitem a amplificação de DNA que esteja numa concentração relativamente baixa numa qualquer mistura. Rappelli e colaboradores (1998), com base em *primers* específicos desenhados por outros (Mitchell *et al.* 1994), desenvolveram um método muito semelhante que permitiu a identificação de *C. neoformans* a partir de LCR de doentes com meningite criptococócica. Esta metodologia revelou-se bastante sensível, pois permitiu detectar DNA de *C. neoformans* no produto infectado com apenas 10 células leveduriformes por mililitro.

A escolha dos *primers* e a sua localização em zonas mais ou menos conservadas podem permitir uma amplificação característica de uma única espécie, grupo de espécies próximas, género ou até níveis hierárquicos mais elevados, como por exemplo todos os eucariontes. Para além dos métodos de detecção directa de *C. neoformans* com PCR (Chen *et al.* 1996b, Fell 1995, Garcia-Hermoso *et al.* 1999), vários outros têm sido descritos que fazem uso de PCR em combinação com outras técnicas, p. e. o produto de amplificação é utilizado como sonda para uma hibridação específica (Cogliati *et al.* 2000, Evertsson *et al.* 2000) ou é sujeito à acção de enzimas de restrição que conduzem a perfis específicos (Chen *et al.* 1995, *idem* 2000, Hopfer *et al.* 1993).

A aplicabilidade do diagnóstico directo utilizando a técnica de PCR depende não só dos *primers*, que devem ser específicos para a espécie em causa, e das condições da reacção de PCR mas, essencialmente, do rendimento da extracção do DNA do microrganismo a partir da amostra biológica. No nosso caso, considerando que nas amostras clínicas infectadas pode estar presente um número muito reduzido de células de *C. neoformans*, o método de extracção directa do DNA tem de garantir não só a lise de todas as células da levedura, para que haja DNA na amostra, mas também que a solução de DNA obtida esteja isenta de inibidores da DNA-polimerase eventualmente provenientes da amostra clínica. A sua aplicação em diagnóstico requer também que o método seja rápido e fácil. Pela importância que podem assumir no êxito dos métodos baseados em PCR para a detecção directa de *C. neoformans*, referimos a seguir alguns aspectos de natureza metodológica relacionados com a extracção de DNA.

Os protocolos de extracção de DNA mais comuns para *C. neoformans*, incluindo ou não um primeiro passo de preparação de protoplastos para ultrapassar o obstáculo da cápsula polissacarídea (Varma & Kwon-Chung 1991, Wickes *et al.* 1994), são habitualmente muito demorados e, no final, podem resultar num fraco rendimento em DNA se à partida houver poucas células (Hopfer *et al.* 1993, Loffler *et al.* 1997, Sambrook *et al.* 1989, Walsh *et al.* 1991).

Em protocolos de medicina forense o uso de *Chelex 100* tem permitido a extracção de DNA de amostras biológicas com um número muito reduzido de células, para aplicação directa em PCR (Singer-Sam *et al.* 1989). O *Chelex 100*, que se apresenta sob a forma de pequenas esferas, é uma resina quelante com grande afinidade para iões metálicos pesados que degradam o DNA. A extracção do DNA com esta resina exige um passo de fervura necessária à quelação dos iões metálicos o qual, em conjunto com o pH alcalino das suspensões de *Chelex* (entre 10 e 11) contribui para a destruição da membrana celular e para a desnaturação do DNA. Pensa-se também que o *Chelex 100* remove as porfirinas livres presentes nas amostras de sangue e que funcionam como inibidores do PCR (Walsh *et al.* 1991). No final, o *Chelex* e todos os constituintes celulares não-DNA são removidos por centrifugação deixando no sobrenadante o DNA de cadeia simples pronto a ser usado em PCR (Brazeau & Clark 2000). A utilização deste composto para o isolamento de DNA directamente a partir de amostras biológicas apresenta vantagens porque: (i) é rápido, (ii) pode ser aplicado a qualquer material biológico, (iii) requer pouca quantidade de produto biológico e (iv) inclui a separação e a purificação do DNA (Schnee-Greese & Linder 1989).

Tanaka *et al.* (1996) demonstraram que a quantidade e qualidade de DNA de *C. neoformans* obtido por destruição mecânica da parede celular e da cápsula por meio de esferas de vidro eram muito superiores às obtidas por lise enzimática com *Novozyme 234*. Sansiforiano *et al.* (1998) verificaram, por outro lado, que a utilização de concentrações elevadas de ureia no tampão de lise permitiam obter quantidades apreciáveis de DNA em razoável grau de pureza a partir de estirpes muito capsuladas de *C. neoformans*. Observaram, igualmente, que a ureia também impedia a degradação do DNA durante pelo menos seis meses, mesmo que as preparações fossem mantidas à temperatura ambiente. Muito recentemente, foi proposto um novo método de extracção de DNA de *C. neoformans* envolvendo a associação destes dois últimos métodos (Bolano *et al.* 2001).

Existe ainda a possibilidade de utilizar um conjunto diversificado de *kits* de extracção e purificação de DNA, como por exemplo PUREGENE[®] *Yeast and Gram positive bacteria* e

PUREGENE[®] D6000 da Gentra Systems, QIAMP TISSUE[®] da Quiagen, Gene Releaser[®] da BioVentures, DNAzol[®] da Molecular Research Center ou Dynabeads DNA DIRECT[®] da Dynal-Oslo. A sua utilização é ainda mais rápida e simples, o que os torna ideais para diagnóstico a partir de amostras clínicas, embora apresentem o grande inconveniente de serem dispendiosos.

Apesar dos métodos baseados em PCR permitirem inegavelmente uma identificação sensível e específica de microrganismos patogénicos, não nos fornecem informações acerca da sua morfologia, número de células, distribuição espacial ou localização histopatológica. Somente a observação ao microscópico, com diferentes colorações, nos facultava essas informações apesar de ser muito limitada quanto a uma identificação fiel dos microrganismos. Por outro lado, a simples observação micromorfológica requer também a cultura do organismo para a sua correcta identificação.

4.1.2. Hibridação *In Situ*

Mais recentemente, com o objectivo de conciliar a observação morfológica com uma sensibilidade e especificidade elevadas, foi desenvolvido um novo método molecular, a hibridação *in situ* ou FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). Esta metodologia utiliza sondas de DNA que têm uma sequência nucleotídica complementar de uma sequência específica do RNA ribossómico do microrganismo a identificar. A sonda é marcada com um composto fluorescente e a sua hibridação com a sequência-alvo, sem destruição das células, permite-nos visualizar e identificar com elevada especificidade as células individuais de microrganismos patogénicos inseridas no seu ambiente natural, como por exemplo, no produto biológico ou no tecido do hospedeiro.

De Long utilizou, pela primeira vez, oligorribonucleótidos marcados com fluorocromos na detecção de células microbianas para discriminar organismos filogeneticamente muito próximos (De Long *et al.* 1989). Comparando os seus resultados com os obtidos com sondas radioactivas utilizadas até então, as sondas fluorescentes, para além de serem mais seguras para o utilizador, revelaram muito melhor resolução. Foram posteriormente desenvolvidos novos marcadores fluorescentes que emitiam a diferentes comprimentos de onda e permitiam detectar mais do que uma sequência-alvo numa única reacção de hibridação. Na última década, o método FISH passou a ser uma ferramenta muito útil em

estudos ecológicos e muito promissora para o diagnóstico microbiológico (Amann *et al.* 1990a, *idem* 1990b).

Em Micologia Médica, a hibridação *in situ* foi muito recentemente aplicada no diagnóstico de leveduras do género *Candida* (Kempf *et al.* 2000). O diagnóstico de candidoses disseminadas sempre foi muito difícil em virtude das hemoculturas serem frequentemente negativas e a observação histológica de leveduras não permitir a identificação ao nível da espécie. Como a sensibilidade aos antifúngicos é muito variável entre algumas espécies deste género, tornou-se necessário desenvolver um método que permitisse uma identificação rápida e simultaneamente específica. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram identificadas por hibridação *in situ*, com um elevado grau de especificidade, em criosecções de órgãos de ratinhos infectados experimentalmente e em células de sangue humano (Kempf *et al.* 2000, Lichewski *et al.* 1996, *idem* 1997). Tanto quanto sabemos, a hibridação *in situ* não foi ainda aplicada a *C. neoformans*.

A aplicação desta técnica inclui as seguintes etapas:

- (i) selecção de uma sequência-alvo no rRNA (ou no rDNA) do microrganismo, que possa ser utilizada como sonda específica;
- (ii) selecção do fluorocromo e do tipo de marcação;
- (iii) fixação e pré-tratamento da amostra;
- (iv) hibridação com a sonda;
- (v) lavagem para remoção da sonda não hibridada e de hibridações não-específicas;
- (vi) montagem e observação das preparações ao microscópio.

O elevado número de moléculas de rRNA numa célula metabolicamente activa proporciona um número de alvos suficiente para que, por meio da hibridação *in situ*, uma única célula se torne visível. Recorrendo a bases de dados disponíveis na Internet (p.e. GenBank), é possível conhecer as sequências nucleotídicas do rDNA e desenhar sondas oligonucleotídicas específicas que permitam identificar géneros ou espécies de uma grande diversidade de organismos, nomeadamente de leveduras.

A molécula-alvo mais usada na técnica FISH aplicada a bactérias tem sido a subunidade 16S do rRNA, não só porque existe num número muito elevado de cópias em cada célula mas também devido à sua estabilidade genética e estrutura com regiões

conservadas e regiões variáveis (Woese 1987). Há, no entanto, autores que preferem a utilização de sequências da subunidade maior (23S-26S) do ribossoma para o desenho de sondas para FISH, em virtude das sequências da subunidade menor não serem suficientemente variáveis para distinguir espécies demasiado próximas (Amann *et al.* 1992, Fox *et al.* 1992). Por outro lado, Fuchs *et al.* (2001) compararam as duas subunidades de rRNA quanto ao desenho de sondas e concluíram não existirem diferenças significativas na hibridação. Contudo, a subunidade maior oferece a vantagem de possuir o dobro do número de possíveis sequências-alvo em relação à subunidade menor.

Na selecção da sequência-alvo deve ser tida em conta a sua especificidade (número e localização de bases nucleotídicas de diferença em relação a outros organismos filogeneticamente próximos), o seu tamanho e composição.

Os oligonucleótidos escolhidos deverão ter entre 15 e 20 nucleótidos (Rice *et al.* 1997a). Oligonucleótidos mais curtos podem penetrar mais facilmente nas células, mas podem ser menos específicos. Deverão ter um conteúdo em GC tal que a temperatura de desnaturação não exceda 60°C nem seja inferior a 46°C. A temperatura de desnaturação é uma função do conteúdo em GC e é calculada através da fórmula $T_m = 4 \times GC + 2 \times AT$. No entanto, as sondas podem revelar temperaturas óptimas de hibridação a temperaturas mais baixas do que as calculadas (Fuchs *et al.* 1998, *idem* 2000).

Os marcadores mais vulgarmente utilizados na hibridação *in situ* em microbiologia (Tabela 4.1) são os derivados da fluoresceína, da rodamina e, mais recentemente, da cianina tais como o Cy3 e o Cy5. Estes últimos têm um desempenho superior por emitirem mais fluorescência e serem mais estáveis (De Long *et al.* 1999).

Tabela 4.1 - Fluorocromos utilizados na detecção directa de microrganismos por hibridação *in situ* com sondas de DNA marcadas.

Fluorocromo	Comprimento de onda (nm)		Cor
	excitação	emissão	
AMCA ^a	351	450	azul
FITC ^b	492	528	verde
Fluo X [®]	488	520	verde
Cy3 [®]	552	570	laranja
Texas Red [®]	578	600	vermelho
Cy5 [®]	651	674	infravermelho

^a AMCA, Ácido 7-metilcoumarina-3-acético; ^b FITC, Isotiocianato de fluoresceína.

Devido à fotostabilidade e ao intenso sinal de fluorescência, o fluorocromo Cy3 é actualmente o mais utilizado na marcação de sondas oligonucleotídicas para hibridação *in situ* (Amann & Ludwig 2000). A sua estrutura química linear permite também que este fluorocromo penetre melhor no ribossoma (Ban *et al.* 2000). Apesar de outros fluorocromos poderem apresentar uma fluorescência mais intensa, a sua estrutura secundária dificulta a acessibilidade da sonda (Fuchs *et al.* 2001).

A marcação das sondas de DNA pode ser directa ou indirecta. Na primeira, a molécula de fluorocromo é ligada directamente à extremidade 5' do oligonucleótido durante a síntese deste ou, em alternativa, o fluorocromo pode ser ligado à extremidade 3' do oligonucleótido por acção de uma transferase terminal (Moter *et al.* 1998). As marcações indirectas podem ser feitas com digoxigenina (DIG), que é detectável por um anticorpo fluorescente, com peroxidase de medula de cavalo, que usa fluoresceína-tiamida como substrato (Schönhuber *et al.* 1999), ou por uma conjugação destas duas metodologias (Moter & Göbel 2000). As marcações indirectas podem originar um sinal de fluorescência mais forte, mas têm a desvantagem de penetrarem dificilmente na célula devido ao seu elevado peso molecular (De Long *et al.* 1999).

As marcações directas são as mais utilizadas. Os oligonucleótidos marcados por este processo são mais rápidos de obter, menos dispendiosos e mais fáceis de utilizar porque não requerem passos de detecção pós-hibridação. A marcação directa permite ainda ligar duas ou mais moléculas de fluorocromo às duas extremidades do oligonucleótido durante a sua síntese com o objectivo de aumentar o sinal de fluorescência. Este tipo de marcação pode ser o mais indicado para microrganismos de crescimento lento, com baixo conteúdo em rRNA (Amann *et al.* 1995). Spear *et al.* (1999) utilizaram uma molécula de fluorocromo na extremidade 3' e quatro na extremidade 5' do seu oligonucleótido, obtendo um aumento significativo do sinal de fluorescência. Actualmente, os oligonucleótidos marcados com fluorocromos podem ser encomendados a empresas, que os sintetizam, e mantidos a -20°C, ao abrigo da luz, durante muitos meses sem perda de sinal.

Antes de proceder à hibridação propriamente dita é necessário começar por fixar as células. Estas deverão ser recolhidas na fase exponencial de crescimento para maximizar o número de ribossomas, pois o sinal de fluorescência diminui significativamente quando a cultura entra na fase estacionária (Lim *et al.* 1993, Rice *et al.* 1997b). O objectivo da fixação consiste em imobilizar as células, facilitar a penetração da sonda e proteger os ribossomas da degradação por acção de RNAses endógenas, mantendo as células morfológicamente

íntegras. Por vezes, para garantir a penetração da sonda fluorescente no interior da célula, torna-se necessário um passo intermédio de permeabilização da membrana celular.

A fixação pode ser conseguida com cloreto de mercúrio, ácido acético ou glutaraldeído (Amann *et al.* 1995), embora actualmente se empreguem agentes precipitantes como o etanol ou o metanol, agentes reticulantes como aldeídos (formaldeído ou paraformaldeído) ou a mistura de ambos. As condições de fixação podem variar em função do organismo em questão e do tipo de amostra e a sua optimização é empírica.

Alguns agentes fixadores podem provocar a lise das células. A sua extensão pode ser avaliada comparando o número de células antes e depois da fixação com a ajuda de um hemacitómetro e, em geral, é aceitável uma perda de 10-20% no número de células (Rice *et al.* 1997a). A fixação pode também provocar alterações nas dimensões das células e esta variação pode ser avaliada ao microscópio. Habitualmente, a variação de diâmetro é da ordem dos 10 a 20% após a fixação (Rice *et al.* 1997a).

Em leveduras, a fixação tem sido feita com etanol ou com uma solução de formaldeído ou paraformaldeído 3 a 4% (Moter & Göbel 2000). Quando é necessário manter as células fixadas por longos períodos de tempo é preferível a fixação com paraformaldeído, embora em geral se obtenha bons resultados com ambos os métodos. A utilização de etanol absoluto tem a vantagem de ser mais rápida e menos elaborada, mas como é um agente precipitante a sua utilização pode provocar a lise das células e a perda do conteúdo celular. O paraformaldeído, pelo contrário, evita a degradação das células na medida em que as encapsula numa matriz. A utilização de paraformaldeído tem, no entanto, a desvantagem de ser mais demorada, mas as células fixadas por este processo podem ser guardadas a -20°C durante meses.

Após a fixação, e para que a amostra adira bem à superfície da lâmina de vidro, é por vezes indicado fazer um tratamento com gelatina ou com polisina (Amann *et al.* 1990b). Se as células estiverem em suspensão estas substâncias podem ser incorporadas directamente na própria suspensão antes de serem colocadas na lâmina de vidro. Para facilitar o acesso da sonda à célula poderá ser necessário fazer um tratamento enzimático adicional (Krimmer *et al.* 1999, Schönhuber *et al.* 1997) ou um tratamento por calor (Jurtshuk *et al.* 1992, Roller *et al.* 1994). Estes tratamentos não só aumentam a acessibilidade da sonda à zona alvo como reduzem as ligações não-específicas.

Na observação de cortes histológicos embebidos em parafina utiliza-se xileno e proteinase K antes da reacção de hibridação. Também se obtiveram bons resultados

aplicando directamente a sonda no tecido embebido em resina polimerizadora (Moter *et al.* 1998). Para além de não requerer nenhuma digestão prévia, a visualização dos microrganismos nestas secções plásticas, assim como a conservação dos cortes histológicos, revelou-se excelente.

A hibridação da sonda à sequência-alvo deverá decorrer sob condições de elevada restringência. A restringência pode ser ajustada fazendo variar a concentração de formamida, que permite baixar a temperatura de desnaturação, e/ou a temperatura de hibridação pois cada 0,5% de formamida equivale a um aumento de 1°C (Manz *et al.* 1992). A hibridação deverá ser efectuada ao abrigo da luz, em câmara húmida (previamente saturada com tampão de hibridação) e a temperaturas entre os 37°C e os 50°C (Fuchs *et al.* 1998). O tempo requerido para a hibridação pode variar entre 30 minutos até algumas horas e deve ser optimizado empiricamente (Jurtshuk *et al.* 1992).

Finda a hibridação, deverá ser aplicado um tampão de lavagem com uma restringência semelhante à do tampão de hibridação, restringência que é regulada fazendo variar a temperatura e a concentração de sal e de EDTA, em substituição da formamida que é tóxica (Lathe 1985). A temperatura de lavagem deverá ser ligeiramente superior à temperatura de hibridação (+ 2°C) para que a sonda ligada a locais não-específicos seja eliminada. No final, a lâmina é novamente lavada com água destilada e seca ao ar em câmara escura, para evitar a diminuição de fluorescência do fluorocromo enquanto ocorre a desidratação da amostra. Posteriormente, a perda gradual de fluorescência é retardada por meio da aplicação de produtos anti-evanescentes antes da observação ao microscópio.

A observação de preparações de hibridação *in situ* requer a utilização de um microscópio de epifluorescência equipado com os filtros selectivos adequados ao fluorocromo utilizado, uma câmara fotográfica ou de vídeo para o registo das imagens e um programa informático adequado que permita a sua digitalização e análise. Pode ser igualmente usado um microscópio confocal com varrimento a laser (Li *et al.* 1997). Este equipamento é o mais indicado para amostras com distribuição espacial ou secções de tecidos (Moter *et al.* 1998), complementado com programas informáticos que permitem a reconstituição das imagens tridimensionais. Este tipo de observação tem, no entanto, o grande inconveniente de exigir um sinal de hibridação muito forte. O registo dos sinais da hibridação *in situ* também se pode fazer utilizando citometria de fluxo. Esta técnica é útil quando se pretende a quantificação das células e da fluorescência, mas não nos permite obter informações sobre a morfologia nem sobre a distribuição espacial dos microrganismos na amostra (Amann *et al.* 1995).

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Método de Detecção Directa Baseado em PCR

Contaminação *in vitro* de amostras clínicas com *Cryptococcus neoformans*

Para a detecção directa pelo método de PCR com o *primer* específico para *C. neoformans* foi seleccionada uma, ou mais, das amostras clínicas (conforme indicado) habitualmente enviadas para o diagnóstico laboratorial de criptococose: LCR (líquido cefalorraquidiano), soro, LBA (lavado bronco-alveolar) e urina.

As amostras foram, primeiro, infectadas artificialmente, *in vitro*, com um número conhecido de células de *C. neoformans* com a finalidade de avaliar a eficiência dos vários métodos de extracção directa de DNA. Posteriormente, para confirmação, os mesmos métodos de extracção foram aplicados a amostras naturalmente infectadas e provenientes de doentes com criptococose disseminada. Sempre que o volume destas amostras clínicas excedia os 200 µl, o mesmo era reduzido por centrifugação de forma a concentrar as células da levedura naquele volume, a partir do qual se prosseguiu para a extracção de DNA.

Extracção de DNA de amostras clínicas

Os diferentes métodos de extracção de DNA ensaiados foram:

- 1 - extracção rápida de DNA
- 2 - extracção com *Chelex 100*
- 3 - extracção com *Novozyme 234*
- 4 - extracção com tampão de ureia e esferas de vidro
- 5 - extracção com o *kit PUREGENE® yeast and Gram-positive bacteria*

Todos estes métodos foram testados a partir de amostras de LCR e soro infectadas *in vitro* com 10^4 células/ml de *C. neoformans*.

1 - Extracção rápida de DNA

Este método de extracção foi descrito anteriormente no Capítulo 3 (3.2.2.) e aplicado a 200 µl de amostra clínica infectada.

2 - Extracção com *Chelex 100*

A 200 µl de amostra clínica infectada foram adicionados 500 µl de Tampão de Lise, o equivalente a 200 µl de esferas de vidro com 0,4-0,6 mm de diâmetro, esterilizadas, e 100 µl de uma suspensão de *Chelex 100* a 50% (p/v). A mistura foi incubada durante 1 h a 65°C. Em seguida, foi agitada fortemente no Vortex, durante 1 min, colocada em água a ferver durante 10 min e novamente agitada no Vortex durante 2 min. Foi então centrifugada a 12 000 g durante 10 min e o sobrenadante com DNA foi recolhido e guardado a -20°C. Em cada reacção de PCR foram usadas alíquotas de 10 µl.

3 - Extracção com *Novozyme 234*

A 200 µl de amostra clínica infectada foram adicionados 500 µl de Tampão de Lise, o equivalente a 200 µl de esferas de vidro com 0,4-0,6 mm de diâmetro, esterilizadas, 10 µl de solução de *Novozyme 234* (500 mg/ml) e 2 µl de proteinase K (450 mg/ml). A mistura foi incubada durante 1 h a 30°C, agitando os tubos de 10 em 10 min. Em seguida, foi agitada muito fortemente no Vortex durante 3 min, incubada durante 1 h a 65°C e novamente agitada no Vortex durante 3 min. Foi então centrifugada a 12 000 g a 4°C, durante 10 min, e o sobrenadante com DNA foi retirado e guardado a -20°C. Foram usadas alíquotas de 10 µl em cada reacção de PCR.

4 - Extracção com tampão de ureia e esferas de vidro

Os produtos biológicos infectados foram centrifugados a 12 000 g durante 5 min. As células sedimentadas foram lavadas uma vez com água destilada esterilizada, a 4°C. Em seguida, o sedimento foi ressuscitado em 500 µl de Tampão de Ureia e incubado à temperatura ambiente durante 3 h, com agitação (\pm 60 rpm). Cada suspensão foi então centrifugada a 4 000 g, durante 5 min, e o sedimento ressuscitado em 400 µl de Tampão de Lise, 400 µl de fenol-clorofórmio 1:1 (pH 8) e 400 µl de esferas de vidro com 0,4-0,6 mm de diâmetro. Alternadamente, a suspensão foi submetida a três ciclos de 3 min para cada passo: agitação forte no Vortex e incubação a 4°C. A amostra foi centrifugada a 12 000 g, à temperatura de 4°C, durante 15 min. O sobrenadante foi recolhido para novo tubo e o DNA foi precipitado com o dobro do volume de etanol 70% (v/v). Depois de seco sob vácuo, o DNA foi ressuscitado em 40 µl TE e conservado a -20°C.

5- Extracção com o kit PUREGENE® yeast and Gram-positive bacteria

Os produtos biológicos infectados foram centrifugados a 12 000 g, durante 5 min, e as células lavadas uma vez com água destilada esterilizada a 4°C. Em seguida foi aplicada a metodologia indicada pelo fabricante do *kit*.

Detecção de *Cryptococcus neoformans* em amostras clínicas por PCR

Foi utilizado um conjunto diversificado de amostras clínicas que foram infectadas *in vitro* com 10³ células/ml de *C. neoformans*: LCR proveniente de três doentes diferentes, três amostras de sangue periférico total às quais foram adicionados anticoagulantes diferentes, soro, urina, LBA, líquido pleural e líquido ascítico. Os anticoagulantes utilizados nas amostras de sangue total (EDTA, citrato de sódio e heparina de lítio) foram adquiridos comercialmente em tubos devidamente preparados (Greiner). O DNA das amostras foi extraído seguindo o protocolo com tampão de ureia e esferas de vidro por ter sido aquele que se revelou mais eficaz (ver Resultados e Discussão). Em seguida, foi realizada uma reacção de PCR (ver 3.2.3.) com o *primer* específico para *C. neoformans* e os dois *primers* que permitem a amplificação da região D1/D2. Como controlo negativo, foi conduzida uma reacção de amplificação com todas as amostras clínicas utilizadas e não infectadas. O DNA da estirpe utilizada para infectar as amostras clínicas, obtido a partir da cultura pura, foi usado como controlo positivo. Os produtos de amplificação foram visualizados após electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídio.

Para avaliar o limite de detecção do método, em relação ao número de células que infectam a amostra, infectou-se uma mesma amostra de LCR com um número variável de células de *C. neoformans*: 10⁴ células/ml, 10³ células/ml, 10² células/ml e 10 células/ml. Foi extraído o DNA a partir dessas quatro diluições e, em seguida, realizada a amplificação por PCR tal como referido.

Numa segunda aplicação do mesmo método de detecção directa, foram utilizadas amostras clínicas provenientes de doentes com infecção criptocócica disseminada. Três das amostras infectadas foram amavelmente cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia do Hospital de Santa Maria em Lisboa e as outras duas foram amostras recebidas para diagnóstico micológico no Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Após a extracção de DNA pelo método com tampão de ureia e esferas de vidro foi realizada a reacção de PCR para amplificação do fragmento específico de *C. neoformans*, seguindo o mesmo protocolo.

4.2.2. Hibridação *In Situ* para Detecção Directa de *Cryptococcus neoformans*

O método para a hibridação *in situ* foi, primeiro, otimizado em células de *C. neoformans* obtidas em cultura laboratorial. Posteriormente, foi aplicado a produtos biológicos humanos infectados *in vitro*.

Seleção da sequência-alvo, desenho e marcação da sonda

A escolha de uma sequência de RNA que permitisse o desenho de uma sonda específica para detectar *C. neoformans* por hibridação *in situ* recaiu na região do gene de rRNA 26S em que se insere o *primer* CN 1, utilizado com êxito na identificação desta levedura por PCR. Como a sequência do *primer* tem 24 nucleótidos e as sondas a empregar em FISH devem ter cerca de 18, foi necessário seleccionar uma sequência mais curta tendo o cuidado de não alterar a sua especificidade. Consultando a base de dados do GenBank, para comparar com sequências equivalentes de leveduras mais próximas, verificou-se que a especificidade do *primer* CN 1 dependia, em grande parte, do nucleótido T localizado na extremidade 3'. Como nas sondas de hibridação *in situ* as bases específicas não devem ficar na extremidade do oligonucleótido, foi escolhida a sequência 5' - TCG GTG GAT AAG GGC TGG - 3'. Consequentemente, a sonda desenhada como específica para *C. neoformans* tem a sequência complementar da sequência-alvo: 5' - CCA GCC CTT ATC CAC CGA - 3' (% mol G+C = 61,11; $T_m = 58^\circ\text{C}$).

Foi, então, encomendado (Amersham Pharmacia Biotech) este oligonucleótido marcado, na sua síntese, com o fluorocromo Cy3 na extremidade 5' da sequência (CN-Cy3, concentração 10 ng/ μl).

Preparação das células

As células de *C. neoformans* foram preparadas para experiências de hibridação *in situ* utilizando dois protocolos, de acordo com os esquemas apresentados na Fig. 4.1. Como controlos negativos, foram utilizadas duas outras leveduras para as quais as sequências correspondentes são muito semelhantes à sequência-alvo escolhida para *C. neoformans*:

Sirobasidium magnum (PYCC 5289) - apresenta uma diferença numa base interna

Cryptococcus laurentii (PYCC 3966) - apresenta diferença de duas bases na extremidade 3'

Preparação das Células para Hibridação *In Situ*

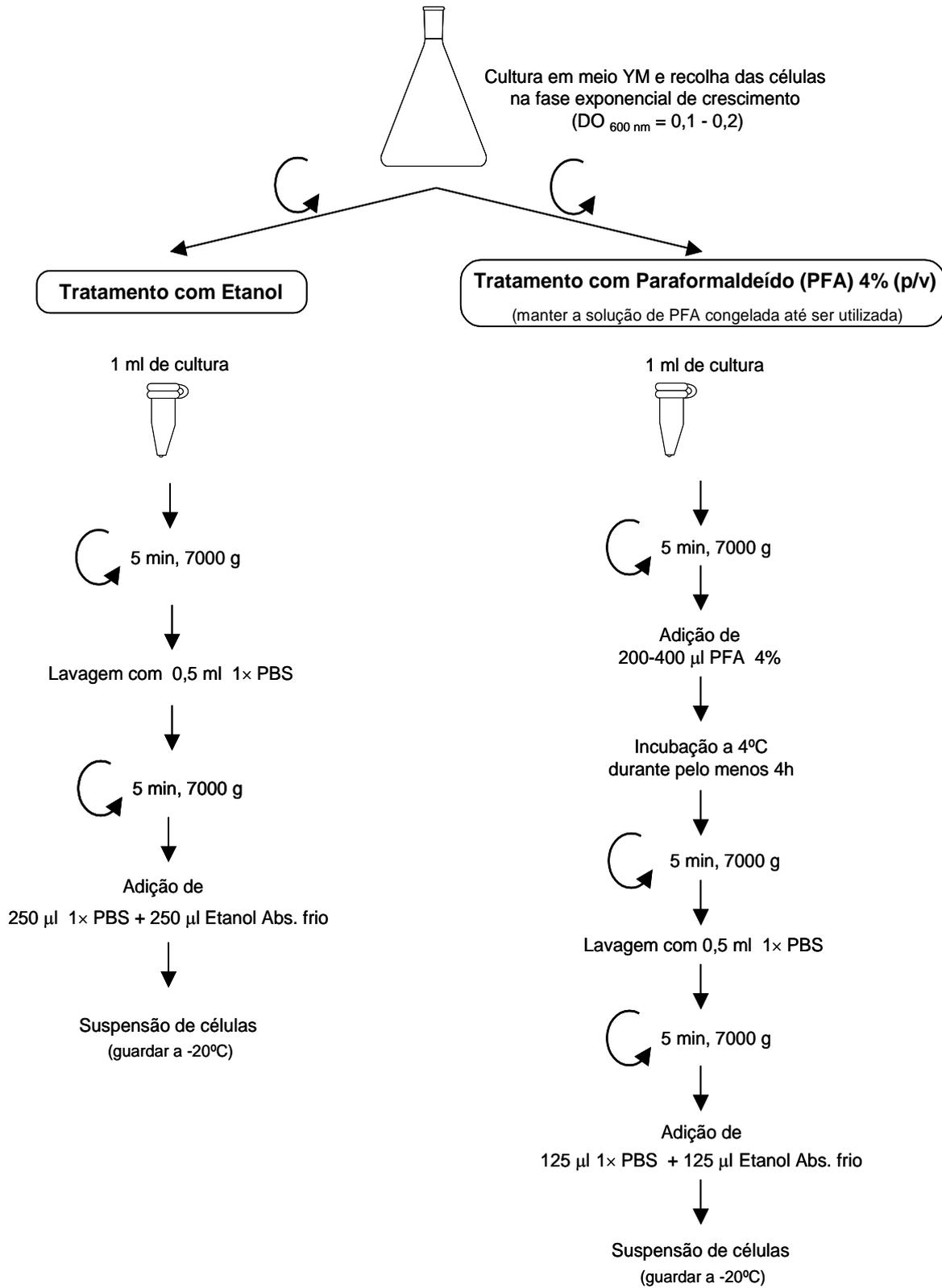


Fig. 4.1 - Metodologias utilizadas na preparação das células de levedura para hibridação *in situ*.

Ainda como controlo negativo da hibridação, foi utilizada uma sonda com uma sequência completamente diferente da sonda CN-Cy3, a sonda DAN 651, específica para *Dekkera anomala* (5' CTG GTT CAA CAC CCG AAG 3'). Qualquer sinal de fluorescência observado com esta sonda seria resultado da existência de ligações não-específicas.

Como controlo positivo, foi utilizada uma sonda universal para eucariontes, EUK 516 (5'- ACC AGA CTT GCC CTC C -3').

Optimização das condições de hibridação

Com o objectivo de confirmar se as células de *C. neoformans*, de *S. magnum* e de *C. laurentii* fixadas se encontravam em boas condições para a hibridação, quanto à permeabilidade e conteúdo celular em RNA, foi feita a hibridação com a sonda universal EUK 516.

Foram também testadas diferentes concentrações de formamida no Tampão de Hibridação com o objectivo de encontrar a concentração óptima para que as células de *C. neoformans* apresentassem um sinal forte e as células de *S. magnum* e *C. laurentii* não apresentassem sinal. As concentrações de formamida testadas variaram entre 20% e 55%, com intervalos de 5%.

Foi determinada a concentração óptima de sonda no Tampão de Hibridação, testando três concentrações diferentes de sonda: 1ng/μl, 1,5ng/μl e 3ng/μl.

Foi igualmente pesquisada a duração óptima de lavagem, avaliando os seguintes períodos de lavagem: 15, 20, 30 e 60 min.

Ensaio de hibridação *in situ*

O procedimento experimental utilizado para os ensaios de hibridação *in situ* está representado na Fig. 4.2. Em cada experiência foram testadas, para além da sonda CN-Cy3, as sondas EUK516 (sonda universal) e DAN 651 (sonda negativa). Simultaneamente, foram realizados testes de autofluorescência sem adição de sonda.

As experiências de hibridação *in situ* foram realizadas em lâminas comuns de microscopia, previamente limpas com etanol 70% v/v, embora haja disponíveis no mercado lâminas preparadas para o efeito (Superior Marienfeld, ref^a 12164201).

Hibridação *In Situ*

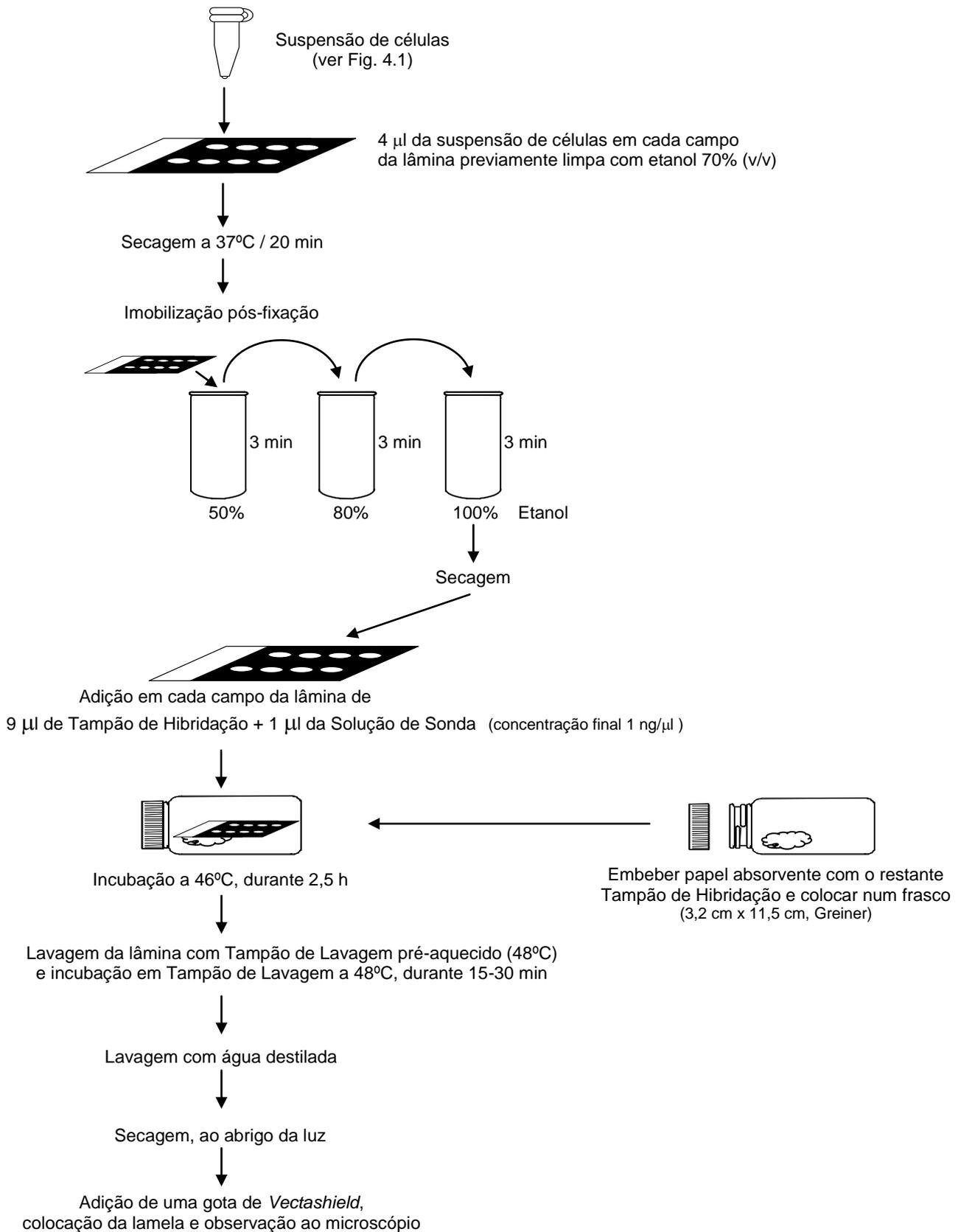


Fig. 4.2 - Metodologia seguida na realização de experiências de hibridação *in situ*.

Foram feitas experiências de hibridação *in situ* com as seguintes estirpes obtidas em cultura e preparadas por fixação com paraformaldeído: 22 estirpes de *C. neoformans* (PYCC 3957^T, CN 4, CN 23, CN 27, CN 34, CN 38, CN 40, CN 43, CN 48, CN 52, CN 54, CN 55, CN 57, CN 59, CN 65, CN 68, CN 73, CN 80, CN 88, CN 95, CN 100 e CN 107), estirpes CN 15 e CN 71, identificadas neste trabalho como *D. hansenii* e *C. albidus*, respectivamente, e os controlos *S. magnum* PYCC 5289 e *C. laurentii* PYCC 3966. Foi igualmente testada uma mistura de células de duas espécies diferentes, *C. neoformans* PYCC 3957^T e *S. magnum* PYCC 5289, com a sonda CN-Cy3 e a sonda universal, com o objectivo de confirmar a especificidade da sonda para *C. neoformans*.

A fim de verificar se o passo da fixação poderia ser futuramente dispensável no diagnóstico directo de *C. neoformans* em amostras clínicas, foram também feitas experiências de hibridação com células retiradas directamente da cultura (PYCC 3957^T, CN 112, PYCC 5025 e *Candida krusei* IHMT 527/97).

Posteriormente, LCR foi artificialmente infectado com células de PYCC 3957^T, CN 59 e CN 71 e utilizadas apenas as sondas CN-Cy3 e EUK 516. Foi igualmente testada uma mistura de *C. neoformans* PYCC 3957^T e *Candida krusei* IHMT 527/97 com ambas as sondas.

Observação ao microscópio

A observação da hibridação *in situ* foi feita num microscópio de epifluorescência OLYMPUS BX50, equipado com lâmpada de mercúrio de 100W, modelo U-ULH e um cubo de fluorescência para o fluorocromo Cy3 do tipo U-MA1007. As imagens foram registadas com o auxílio de uma máquina fotográfica digital OLYMPUS, modelo C3030-ZOOM.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Método de Detecção Directa Baseado em PCR

A aplicação de diferentes métodos de extracção a dois tipos de amostras clínicas (LCR e soro) infectados *in vitro* com DNA de *C. neoformans* permitiu seleccionar o mais eficiente, i. e. o que originava melhor rendimento (Fig. 4.3).

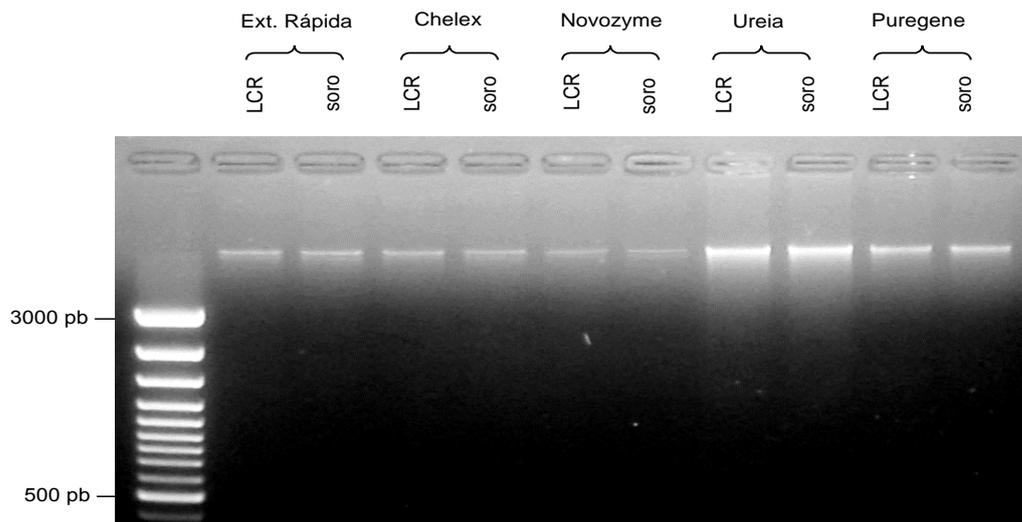


Fig. 4.3 - Comparação da eficiência de cinco métodos diferentes de extracção de DNA a partir de amostras clínicas infectadas com 10^4 células/ml de *C. neoformans*. Para detalhes *vide* Materiais e Métodos (4.2.1).

O método de extracção que utiliza tampão de ureia e esferas de vidro provou ser o mais eficaz. A elevada concentração de ureia contribui para a destruição da cápsula polissacarídea e, simultaneamente, a sua acção proteolítica inibe as enzimas libertadas durante a lise das células (Bolano *et al.* 2001, Sansinforiano *et al.* 1998). A agitação com esferas de vidro de diâmetro reduzido completa o processo de lise por meio da ruptura mecânica da parede celular. A utilização de esferas de vidro por si só é insuficiente, principalmente na presença de estirpes excepcionalmente capsuladas, como prova o baixo rendimento obtido com os outros três métodos de extracção de DNA que também as

utilizou. A extracção de DNA com o *kit* PUREGENE[®] *yeast and Gram-positive bacteria* foi o segundo melhor quanto à quantidade de DNA de *C. neoformans* obtida.

Em relação aos critérios facilidade e rapidez de execução, qualquer dos dois melhores métodos de extracção é fácil de executar e requer um tempo semelhante para a sua execução (± 4 horas). Relativamente ao custo, a utilização do *kit* tem o inconveniente de tornar o diagnóstico mais dispendioso.

Utilizando o método de extracção com ureia, foi então extraído o DNA de vários tipos de amostras infectadas *in vitro*. As amostras incluíram LCR proveniente de diferentes doentes, sangue periférico total (com anticoagulantes), soro, urina, LBA, líquido pleural e líquido ascítico. A quantidade de DNA obtido nestas extracções foi suficiente para a amplificação do fragmento específico que permite o diagnóstico de *C. neoformans* (Fig. 4.4). O resultado da amplificação por PCR melhorou significativamente com a adição de BSA à mistura de reacção (concentração final de 0,01% p/v), em virtude desta proteína neutralizar a acção de inibidores da polimerase eventualmente presentes nas amostras.

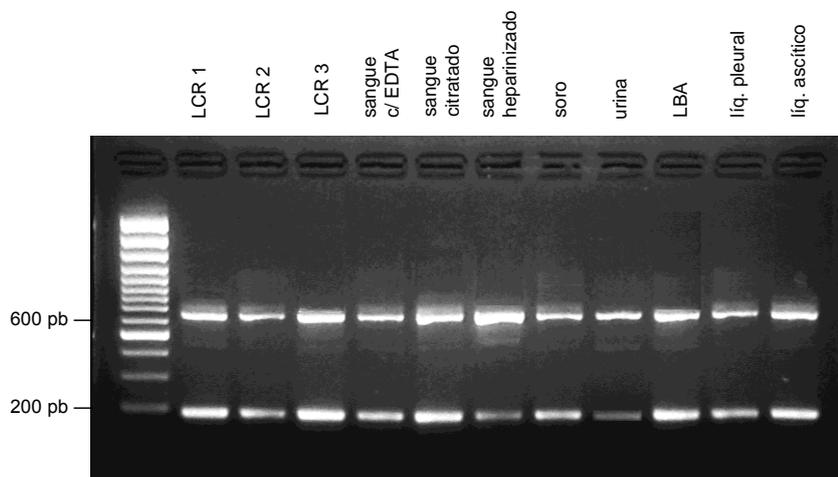


Fig. 4.4 - Separação electroforética dos produtos de amplificação por PCR obtidos a partir de DNA extraído de diferentes amostras clínicas infectadas *in vitro* com 10^3 células/ml de *C. neoformans*, utilizando os *primers* que permitem a detecção da banda específica (200 pb) de *C. neoformans* (ver Fig. 3.6).

Como as amostras clínicas acima citadas foram infectadas com uma quantidade elevada de células (10^3 /ml) de *C. neoformans*, considerámos necessário determinar o limite de sensibilidade do método aplicado. Variando a concentração celular, foram novamente feitas extracções de DNA, utilizando apenas amostras de LCR, e realizada a mesma

reação de PCR. Observou-se que o método é capaz de detectar pelo menos 10 células de *C. neoformans* por mililitro de amostra clínica (Fig. 4.5).

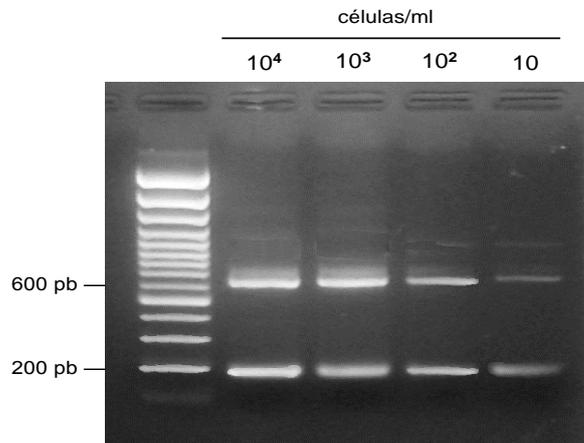


Fig. 4.5 - Separação electroforética dos produtos de amplificação por PCR obtidos a partir de DNA extraído de amostras de LCR infectadas com diferentes concentrações celulares de *C. neoformans* CN 55.

Finalmente, a aplicação do mesmo método de detecção directa por PCR a partir de amostras clínicas provenientes de doentes com criptococose disseminada permitiu confirmar a sua aplicabilidade no diagnóstico molecular de *C. neoformans* (Fig. 4.6). Em resumo, a adaptação do método de identificação molecular por PCR analisado neste trabalho à detecção directa de *C. neoformans* a partir de produtos infectados revelou-se muito promissora, em particular pela sensibilidade e rapidez com que a resposta pode ser dada.

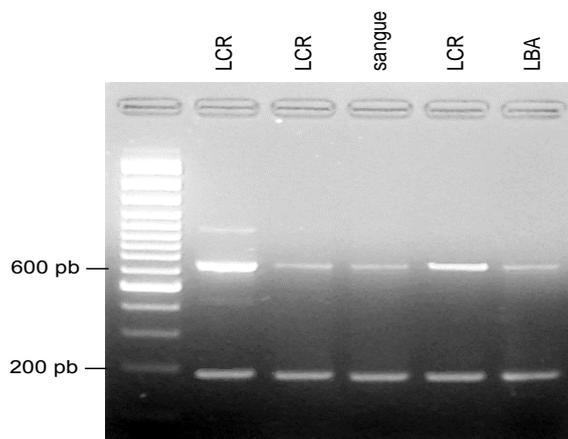


Fig. 4.6 - Detecção directa de *C. neoformans* a partir do DNA extraído de amostras clínicas provenientes de doentes com criptococose sistémica por separação electroforética dos produtos de amplificação por PCR.

4.3.2. Hibridação *In Situ*

Na preparação das células de *C. neoformans* para hibridação *in situ* com sondas fluorescentes foram testados dois métodos, com etanol e com paraformaldeído. Utilizando etanol, os sinais obtidos com a sonda CN-Cy3 em *C. neoformans* foram muito fracos. Uma lavagem prévia das células com EDTA salino, antes da adição de etanol, melhorou muito o sinal sugerindo que se poderia tratar de uma acção inibitória associada à cápsula e/ou à parede celular que teria sido removida pelo EDTA salino. No entanto, como a aplicação directa da sonda em células de *C. neoformans* sem tratamento prévio com etanol resultou sempre num sinal muito forte, é mais provável que o enfraquecimento de sinal tenha sido consequência de uma interacção entre as membranas celulares e o etanol, alterando a acessibilidade da zona alvo no RNA ribossómico. Em contrapartida, a fixação das células com paraformaldeído foi eficaz com todas as estirpes estudadas.

A hibridação com a sonda universal EUK 516 resultou num sinal muito forte com todas as espécies incluídas neste estudo: *C. neoformans*, *C. albidus*, *C. laurentii*, *D. hansenii* e *S. magnum*. Estes sinais fortes de hibridação com a sonda universal indicaram que as células estavam permeáveis à entrada da sonda e o conteúdo celular em RNA era elevado.

Relativamente à optimização da concentração de formamida, essencial para uma hibridação mais ou menos específica, observou-se que com uma concentração de 20% o sinal de hibridação era semelhante para *C. neoformans*, *S. magnum* e *C. laurentii*. O aumento gradual da concentração de formamida resultou numa diminuição gradual do sinal de fluorescência para as três espécies, decréscimo esse muito mais acentuado para *S. magnum* e *C. laurentii*. Entre 40% e 50% de formamida, o sinal obtido com *C. neoformans* era significativamente mais intenso do que os sinais observados para as outras duas espécies, permitindo a sua nítida diferenciação. Como a concentrações mais elevadas de formamida o sinal obtido com células de *C. neoformans* já era demasiado fraco, foi escolhida a concentração de 45% para incluir nas condições de hibridação.

Em relação aos diferentes tempos de lavagem, observou-se que com 15 minutos já se registavam diferenças nítidas entre *C. neoformans* e as outras duas espécies. No entanto, a eliminação de alguma fluorescência basal requereu uma lavagem durante 30 minutos. Com 60 minutos de lavagem o sinal de *C. neoformans* diminuía significativamente devido à destruição de ligações específicas.

Tendo sido testadas diferentes concentrações de sonda, observou-se que a concentração mais baixa (concentração final de 1 ng/μl) permitia ter um sinal suficientemente forte para *C. neoformans* e inexistente para *S. magnum* e *C. laurentii*. Foi, portanto, a concentração de sonda adoptada nas experiências seguintes.

Para tentar eliminar alguma fluorescência de fundo, por vezes observada em algumas preparações, foi adicionado BSA 0,2% ou 100 ng/μl de DNA de esperma de salmão ao tampão de hibridação. Tem sido referido que estes dois produtos diminuem o número de ligações não-específicas (Rice *et al.* 1997a, *idem* 1997b). Na nossa experiência não se registou, no entanto, nenhuma diferença de resultados com a sua utilização.

O resultado dos testes de autofluorescência realizados através de hibridação *in situ* sem a aplicação de sonda foi sempre negativo. A hibridação com a sonda DAN 651 (sonda específica para *Dekkera anomala*), utilizada como controlo negativo, resultou numa ausência de sinal de fluorescência com todas as estirpes testadas.

Optimizadas as condições de hibridação, foram realizados os ensaios com células de *C. neoformans* obtidas em cultura laboratorial e fixadas com paraformaldeído. Com todas as estirpes de *C. neoformans* testadas foram observados sinais positivos de hibridação com a sonda CN-Cy3 (Fig. 4.7 A e B). Com os isolados CN 15 (*D. hansenii*), CN 71 (*C. albidus*), *S. magnum* PYCC 5289 e *C. laurentii* PYCC 3966 (Fig. 4.7 C) não se observou nenhum sinal de fluorescência com a sonda específica para *C. neoformans*. Todas as estirpes de todas as espécies estudadas deram sinais positivos de hibridação com a sonda universal EUK 516 (Fig. 4.7 D) e ausência de sinal com a sonda DAN 651. Quando aplicada à mistura de duas espécies diferentes (*C. neoformans* PYCC 3957^T e *S. magnum* PYCC 5289), a sonda CN-Cy3 somente hibridou com as células de *C. neoformans* (Fig. 4.8 A), enquanto se observou fluorescência em todas as células com a sonda EUK 516.

É de assinalar que as experiências de hibridação com células não fixadas (retiradas directamente da cultura) originaram resultados idênticos aos obtidos com células fixadas, sendo o sinal de fluorescência de intensidade semelhante (Fig. 4.8 B, C e D). Estes resultados indicam que o passo de fixação será dispensável no diagnóstico directo a partir de amostras clínicas, o que permitirá encurtar o tempo de resposta.

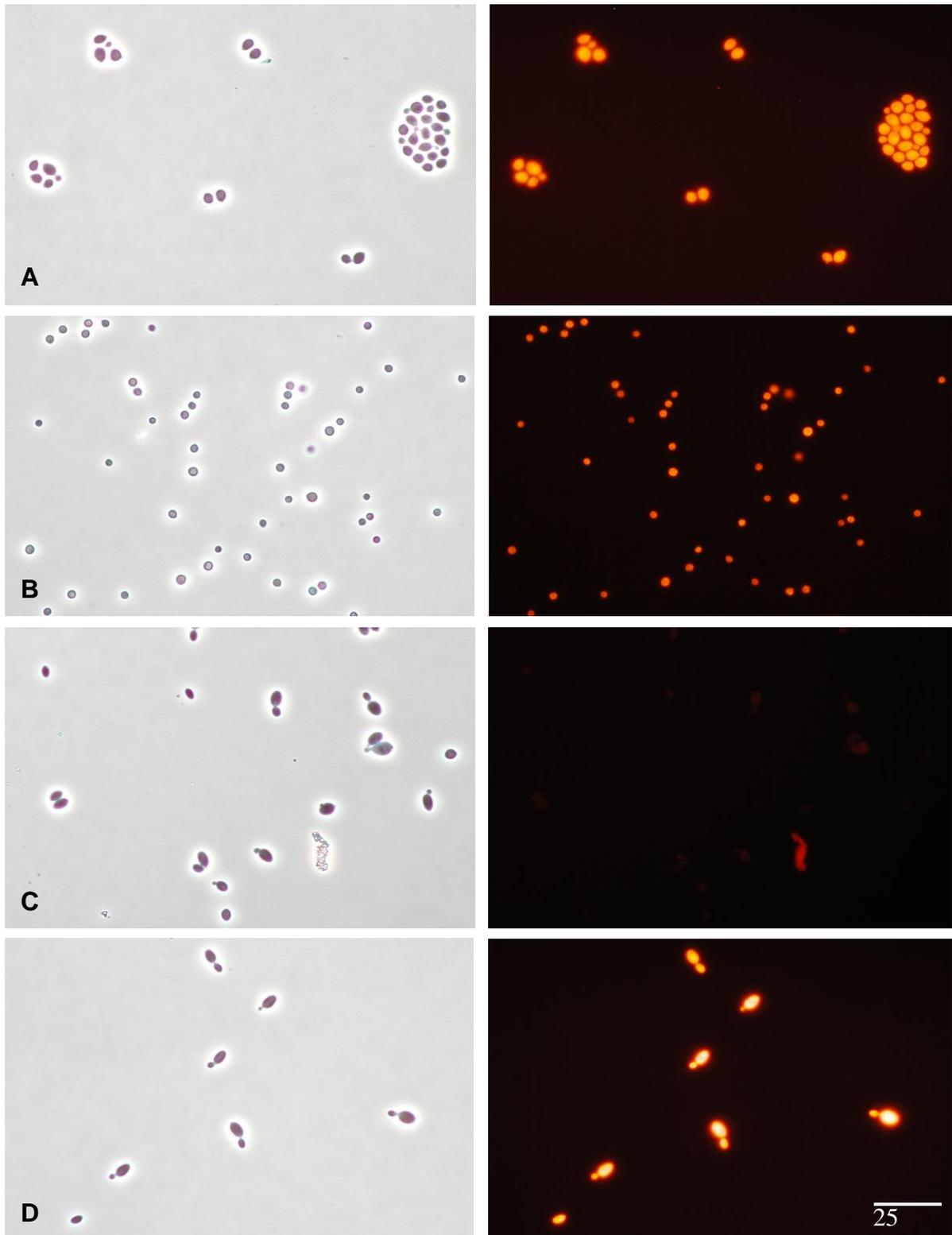


Fig. 4.7 - Hibridação *in situ* de células de levedura, obtidas em cultura laboratorial e fixadas com paraformaldeído, com sondas de DNA marcadas com Cy3. Imagens obtidas com óptica de contraste de fase (esquerda) e com filtro de epifluorescência (direita). (A) *C. neoformans* PYCC 3957^T com a sonda CN-Cy3; (B) *C. neoformans* CN 59 com a sonda CN-Cy3; (C) *C. laurentii* PYCC 3966 com a sonda CN-Cy3 e (D) *C. laurentii* com a sonda universal EUK 516.

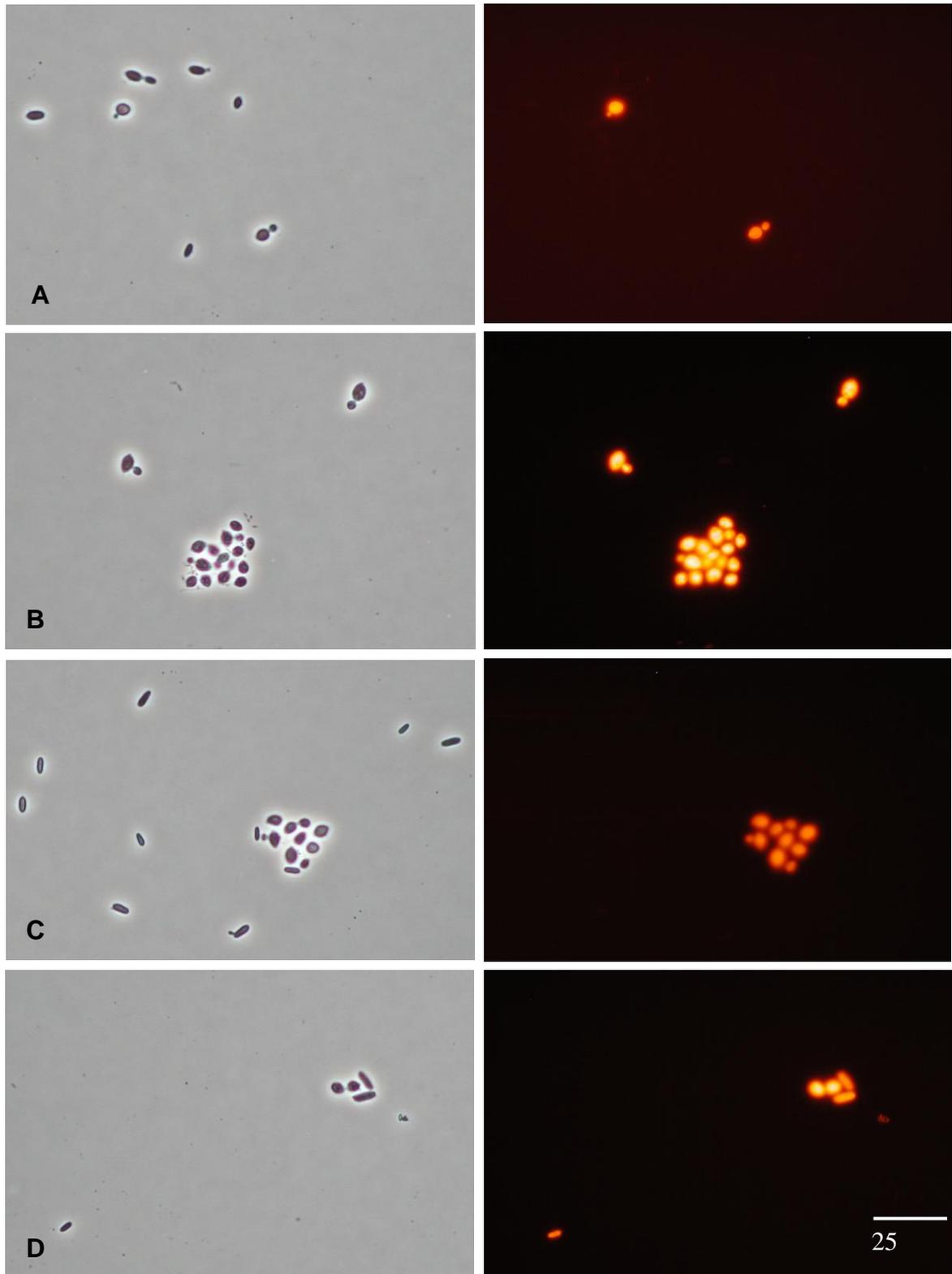


Fig. 4.8 - Hibridação *in situ* de células de levedura, obtidas em cultura laboratorial, com sondas de DNA marcadas com Cy3. Imagens obtidas com óptica de contraste de fase (esquerda) e com filtro de epifluorescência (direita). (A) mistura de células de *C. neoformans* PYCC 3957^T e de *S. magnum* PYCC 5289 fixadas com paraformaldeído, com a sonda CN-Cy3; (B) células de *C. neoformans* PYCC 3957^T, sem fixação, com a sonda CN-Cy3; (C) mistura de células de *C. neoformans* PYCC 3957^T com células de *Candida krusei* (IHMT 527/97), sem fixação, com a sonda CN-Cy3 e (D) *idem*, com a sonda universal EUK 516.

Em todas as amostras de LCR infectadas com células de *C. neoformans* foram observados sinais de fluorescência com a sonda CN-Cy3. Com a sonda universal EUK 516 observou-se fluorescência com todas as espécies testadas. Nas amostras inoculadas com a mistura de duas espécies diferentes (*C. neoformans* PYCC 3957^T e *Candida krusei* IHMT 527/97) a sonda específica apenas hibridou com as células de *C. neoformans* (Fig. 4.9 A) e a sonda universal produziu fluorescência em todas as células (Fig. 4.9 B).

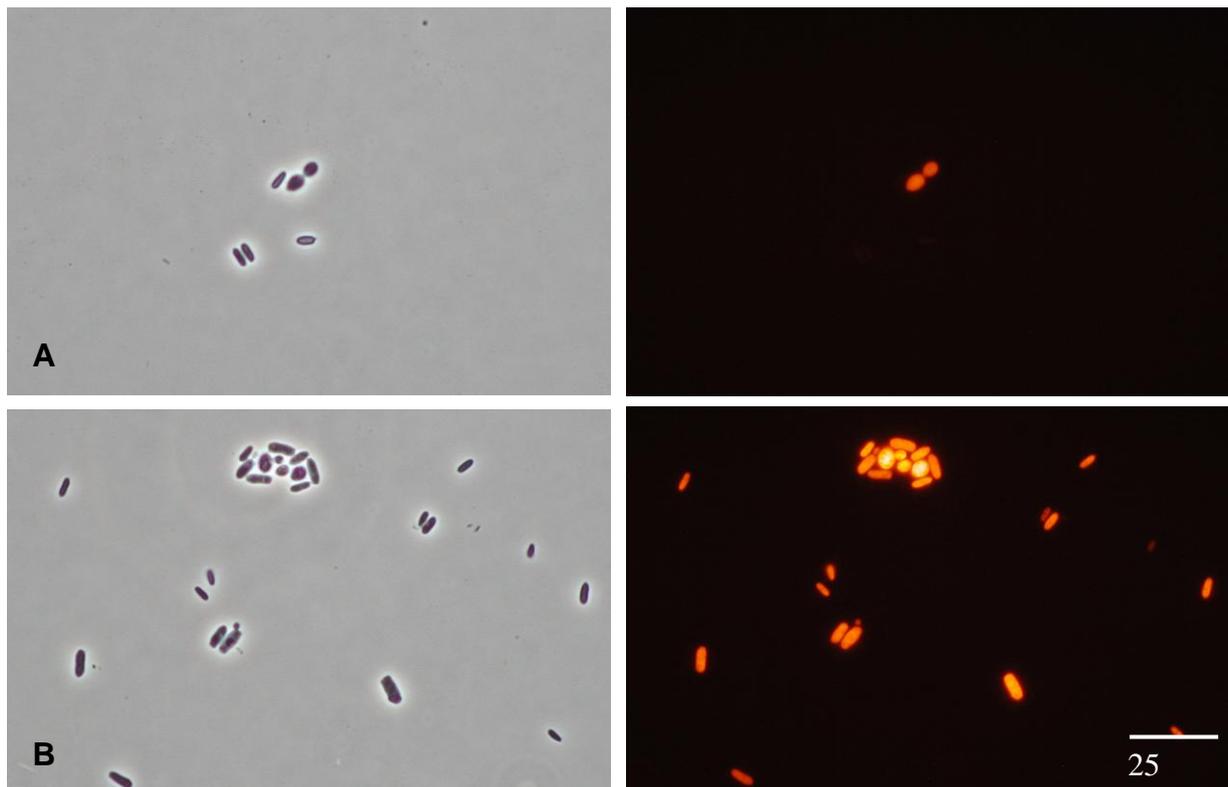


Fig. 4.9 - Hibridação *in situ* de células de levedura em LCR infectado *in vitro* com sondas de DNA marcadas com Cy3. Imagens obtidas com óptica de contraste de fase (esquerda) e com filtro de epifluorescência (direita). (A) mistura de *C. neoformans* PYCC 3957^T com *Candida krusei* IHMT 527/97, com a sonda CN-Cy3; (B) *idem*, com a sonda EUK 516.

Em sùmula, podemos constatar que a sonda CN-Cy3 revelou um índice de especificidade muito elevado para a detecção de *C. neoformans*. Uma vez otimizadas as condições de hibridação, o método FISH é de execução rápida e muito simples. Deve ser realçado que o LCR, o produto biológico mais vulgarmente recebido nos laboratórios de microbiologia clínica para o diagnóstico da criptococose, não evidenciou conter inibidores da reacção de hibridação nem apresenta autofluorescência nas condições utilizadas.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1. AS VARIEDADES DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

A levedura patogénica oportunista *Cryptococcus neoformans* está amplamente distribuída por todo o Globo e pode ser a causa de infecções potencialmente fatais, em particular em doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (VIH). Existem, no entanto, variações significativas epidemiológicas, fenotípicas e genotípicas entre as suas estirpes. É com base nessas diferenças e na composição antigénica dos polissacáridos da cápsula que esta espécie, que representa o estado anamórfico do basidiomiceta *Filobasidiella neoformans*, tem sido dividida em duas variedades e cinco serotipos (Tabela 5.1). Apesar desta divisão taxonómica ter imperado durante bastante tempo, os estudos moleculares desenvolvidos nos últimos anos detectaram a existência de novas heterogeneidades genéticas que conduziram a recentes sugestões para alteração da nomenclatura, reconhecendo duas espécies separadas em vez de variedades.

Neste trabalho, para evitar confusões geradas por frequentes mudanças de nome e facilitar a comparação com estudos de outros autores, optámos por fazer referência a *C. neoformans* e às suas variedades usando as designações pelas quais são vulgarmente conhecidas na literatura médica: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*.

Na década de 80, o cruzamento de uma estirpe de *F. neoformans* (serotipo D, *Mata*) com uma estirpe de *F. bacillispora* (serotipo A, *Mata*) tinha permitido obter uma progenia viável (Kwon-Chung *et al.* 1982a, Schemeding *et al.* 1981), o que levou a re-classificar as duas espécies em variedades. Contudo, na altura, não foi feita a análise genética dos basidiósporos resultantes desse cruzamento e os resultados de interfertilidade não foram correctamente interpretados. Um grau baixo de complementaridade genómica entre isolados das duas variedades e diferenças no conteúdo molar em guanina e citosina do DNA nuclear (Aulakh *et al.* 1981) foram o ponto de partida para a recente separação em duas espécies distintas (Boekhout *et al.* 2001): *C. neoformans* (sin. *C. neoformans* var. *neoformans*) e *C. bacillisporus* (sin. *C. neoformans* var. *gattii*).

Vários métodos de tipagem têm permitido distinguir as variedades *neoformans* e *gattii*, como por exemplo os cariótipos electroforéticos (Boekhout *et al.* 1997, Wickes *et al.* 1994),

polimorfismos RAPD (Boekhout *et al.* 1997), seqüências da região intergênica do rDNA (Diaz *et al.* 2000) e genótipos AFLP (Boekhout *et al.* 2001).

Tabela 5.1 - Características diferenciais das duas variedades de *Cryptococcus neoformans*.

Característica	var. <i>neoformans</i>	var. <i>gattii</i>	Referências
Habitat preferencial	Solo, excrementos de aves	Eucaliptos	Ellis & Pfeiffer 1990b Emmons 1955
Distribuição geográfica	Ampla	Zonas tropicais e subtropicais	Kwon-Chung & Bennett 1992 Pfeiffer & Ellis 1991
Incidência em doentes com SIDA	Elevada	Muito fraca	Rinaldi <i>et al.</i> 1986
Serotipos	A, D e AD	B e C	Kwon-Chung & Bennett 1984a
Basidiósporos (teleomorfo)	esféricos/ovais paredes rugosas	bacilares paredes lisas	Kwon-Chung 1976b Kwon-Chung <i>et al.</i> 1982a
Sensibilidade à L-canavanina	+	-	Kwon-Chung <i>et al.</i> 1982b
Inibição da urease por EDTA	+	-	Kwon-Chung <i>et al.</i> 1987
Regulação retroactiva da creatinina desaminase	+	-	Polacheck & Kwon-Chung 1980
Assimilação de malato	-	+	Bennett <i>et al.</i> 1978
Assimilação de D-prolina	-	+	Nishikawa <i>et al.</i> 1996
Assimilação de D-triptofano	-	+	Mukamurangwa <i>et al.</i> 1995
Assimilação de glicina (% estirpes)	10-20	100	Min & Kwon-Chung 1986
N.º de cromossomas	12	13	Wickes <i>et al.</i> 1994
Dimensão do cromossoma mais pequeno (kb)	770	400-700	Wickes <i>et al.</i> 1994
Dimensão do genoma (Mb)	15-27	12-18	Boekhout <i>et al.</i> 1997

Os resultados obtidos no decurso deste trabalho confirmaram uma marcada divergência molecular entre as estirpes das duas variedades. Os isolados de *C. neoformans* var. *gattii* (PYCC 5025, PYCC 5026, PYCC 5027 e PYCC 5028) evidenciaram valores de reassociação DNA-DNA muito baixos (28-33%) com a estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *neoformans*. Os polimorfismos de regiões microssatélite e dos fragmentos de restrição da região intergênica do rDNA revelaram-se igualmente distintos (Tabela 5.2). Todos estes

Tabela 5.2 - Quadro sinóptico das características analisadas em todas as estirpes incluídas neste estudo e fenotipicamente identificadas como *Cryptococcus neoformans*.

Estirpe ^a	Origem	Amostra	Morfologia ^b	T _{max} (°C)	Teste CGB	Serotipo	Melanização	Hidrólise da Caseína	Hidrólise da Gelatina	Proteases Asparticas	Identificação por PCR	% mol G + C	Reassociação ^c DNA-DNA	Sequenciação D1/D2 26S rDNA	Padrão MS-PCR	Padrão RFLP-IGS	Deteção Directa PCR	Hibridação <i>in situ</i>
CN 2	PL	LCR	Células alongadas	30	-	A	+	++	+++	+	+	51,1	100	+	II	2		
CN 4	MB HIV2	LCR		38	-	A	+	+++	+++	++	+				I	1		+
CN 15	pombo	fezes		38	+++	nd	±	nd	nd	nd	-	33,5	<i>Deb. hansenii</i>	nd	nd	nd		-
CN 23	RF	LCR	Mucosa	38	-	A	+	+++	+++	++	+			I	1		+	+
CN 24	RM	LCR	Mucosa	38	-	A	+	+++	+++	++	+			I	1			
CN 27	SI	LCR		38	-	A	+	++	+++	±	+			I	1			+
CN 32	HF 1	Sangue		39	-	A	+	++	+++	+	+			I	1			
CN 50	HF 2	LCR		39	-	A	+	++	+++	+	+			I	1			
CN 59	HF 3	LCR		39	-	A	+	++	+++	+	+			I	1			+
CN 70	HF 4	LCR		38	-	A	+	+	+++	+	+			I	1			
CN 71	HF 8	Sangue		31	+	nd	-	nd	nd	nd	-	49,7	<i>C. albidus</i>	V	nd	nd		-
CN 74	HF 5	LCR		38	-	A	+	++	+++	+	+			I	1			
CN 83	HF 6	LCR		39	-	A	+	++	+++	+	+			I	1			
CN 92	HF 7	LCR		39	-	A	+	++	+++	+	+			I	1			
CN 34	JN	LCR		38	-	A	+	+++	+++	+	+			I	1			+
CN 38	JA 1	Sangue		37	-	AD	+	+++	+++	±	+			II	2			+
CN 40	JA 2	LCR		37	-	AD	+	+++	+++	±	+			II	2			+

Tabela 5.2 (continuação)

Estirpe ^a	Origem	Amostra	Morfologia ^b	T _{max} (°C)	Teste CGB	Serotipo	Melanização	Hidrólise da Caseína	Hidrólise da Gelatina	Proteases Aspárticas	Identificação por PCR	% mol G + C	% Reassociação ^c DNA-DNA ^c	Sequencição D1/D2 26S rDNA	Padrão MS-PCR	Padrão RFLP-IGS	Deteção Directa PCR	Hibridação <i>In situ</i>
CN 43	micoteca	LCR	Pastosa	38	-	A	+	+	+++	±	+				I	1		+
CN 48	AV	Pele		35	-	D	+	+++	+++	±	+	48,9	98		II	2		+
CN 49	JC 1	LCR		38	-	AD	+	+++	+++	±	+				II	2		
CN 52	JC 2	Sangue		38	-	AD	+	+++	+++	±	+				II	2		+
CN 54	AB	LCR	Mucosa	38	-	A	+	+++	+++	±	+			+	I	1		+
CN 55	MF	LCR	Pastosa	39	-	A	+	+++	+++	±	+				I	1	+	+
CN 57	SS	LCR		39	-	A	+	+++	+++	+	+				I	1		+
CN 65	JB	LCR		38	-	A	+	+	+++	±	+				II	2		+
CN 68	VG 1	Pele		37	-	D	+	+	+++	+	+				II	2		+
CN 77	VG 2	Pele		37	-	D	+	+	+++	±	+	48,8	97	+	II	2		
CN 73	UO	Pele		33	-	AD	+	+++	+++	±	+	48,9	100	+	II	2		+
CN 79	PS	LCR		37	++	D	+	+++	+++	+	+				II	2		
CN 80	PT	LCR		33	++	D	+	++	+++	+	+	49,6	94	+	II	2		+
CN 87	MG 1 HIV-	Pulmão		38	-	A	+	++	+++	±	+				I	1		
CN 88	MG 2 HIV-	LCR		38	-	A	+	++	+++	±	+				I	1		+
CN 95	AP	LCR		34	-	A	+	++	+++	+	+	49,9	99		I	1		+
CN 100	RC	LCR		39	-	A	+	+++	+++	±	+				I	1		+
CN 107	EP	LCR		38	-	AD	+	++	+++	±	+				II	1		+

Tabela 5.2 (continuação)

Estirpe ^a	Origem	Amostra	Morfologia ^d	T _{max} (°C)	Teste CGB	Serotipo	Melanização	Hidrólise da Caseína	Hidrólise da Gelatina	Proteases Aspáticas	Identificação por PCR	% mol G + C	% Reassociação ^c DNA-DNA	Sequenciação D1/D2 26S rDNA	Padrão MS-PCR	Padrão RFLP-IGS	Deteção Directa PCR	Hibridação <i>in situ</i>
CN 109	NA	LCR		36	-	D	+	++	+++	++	+				II	2		
CN 112	pombo	fezes	Mucosa	34	-	A	+	+	+++	±	+	50,2	60	+ ^d	I	1		
CN 118	MS	LCR		37	-	A	+	+	+++	±	+				I	1		
CN 119	CT	LCR		39	+	A	+	+++	+++	±	+				II	2		
CN 123	JF	LCR	Pastosa	39	-	A	+	+++	+++	+	+				I	1		
PYCC 3528	?			39	+	D	+	±	+++	+	+				II	2		
PYCC 3529	?			36	-	A	+	++	+++	±	+				II	2		
PYCC 3530	?			36	+	A	+	-	+++	+	+				I	1		
PYCC 3533	?		Mucosa	38	+	A	+	-	+++	+	+				I	1		
PYCC 3534	pele		Mucosa	38	-	A	+	-	+++	+	+				I	1		
PYCC 3957 ^T	sumo fruta			39	-	D	+	+++	+++	±	+	49,3			II	2	+	+
PYCC 4208	pombo			39	±	AD	+	+++	+++	±	+				II	2		
PYCC 5025	eucalipto		Mucosa	37	+++	B	+	-	+++	+	+	50,2	28	+ ^d	III	3		
PYCC 5026	eucalipto		Mucosa	38	+++	B	+	-	+++	+	+	48,8	29	+	III	3		
PYCC 5027	eucalipto		Mucosa	35	+++	B	+	-	+++	+	+	50,2	28	+	III	3		
PYCC 5028	eucalipto		Mucosa	37	+++	B	+	++	+++	+	+	49,7	33	+	IV	4		

+, positivo; -, negativo; nd, não determinado; ^a PYCC, Portuguese Yeast Culture Collection, Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, Portugal; ^b apenas se assinalam as estirpes que apresentam uma morfologia menos comum; ^c reassociação com a estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *neoformans* PYCC 3957^T; ^d sequências com três bases de diferença em relação à estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *neoformans* CBS 132^T e com quatro bases de diferença em relação à estirpe-tipo de *C. neoformans* var. *gattii* CBS 6289^T.

dados concordam mais com a proposta de separação em duas espécies do que com a manutenção de duas variedades de uma mesma espécie. No entanto, vale a pena recordar que apenas uma base na sequência da região D1/D2 do gene de rRNA 26S separa a var. *neoformans* da *gattii*, resultado que não concorre para a decisão de separar as espécies.

Quanto a características fenotípicas, não se registaram diferenças entre as variedades *neoformans* e *gattii* nos valores de T_{max} , na capacidade de melanização e na actividade proteolítica (Tabela 5.2), embora nesta última se tenha observado uma incapacidade mais consistente (mais evidente a 25°C do que a 37°C) das estirpes da var. *gattii* em hidrolisar a caseína. Os resultados do teste CGB, que avalia a susceptibilidade à L-canavanina/assimilação de glicina, foi notoriamente positivo apenas para as estirpes da var. *gattii*. Os nossos dados serológicos confirmaram ainda a associação dos serotipos A, D e AD à var. *neoformans* e B à var. *gattii*.

Apesar dos valores elevados de reassociação DNA-DNA entre isolados dos serotipos A e D e das estirpes serem capazes de hibridar originando descendência fértil, o que indica pertencerem à mesma espécie (Kwon-Chung 1975), trabalhos recentes vieram salientar a existência de diferenças genéticas e na estrutura capsular (Cherniak & Sundstrom 1994) que conduziram a uma proposta de separação dos serotipos A e D de *C. neoformans* em duas variedades distintas (Franzot *et al.* 1999): *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) e *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A).

Os resultados obtidos neste trabalho relativamente à caracterização molecular de *C. neoformans* vieram confirmar, igualmente, a diferenciação de grupos distintos entre as estirpes da var. *neoformans*. A aplicação de metodologias sensíveis, tais como o estudo dos polimorfismos de regiões mini/microsatélites (MS-PCR) ou dos polimorfismos de restrição de regiões variáveis do DNA ribossómico (RFLP-IGS), permitiu observar uma correlação entre os grupos formados e os serotipos (Tabela 5.2). As estirpes do serotipo A ficaram agrupadas, com ambos os métodos, separadamente das estirpes do serotipo D e AD. A inclusão de algumas estirpes do serotipo A (CN 2, CN 65, CN 119 e PYCC 3529) nos grupos essencialmente constituídos pelos serotipos D e AD pode estar relacionada com a existência de possíveis estirpes híbridas resultantes de trocas de material genético entre estirpes dos serotipos A e D através de reprodução (para)sexuada ou sexuada (Boekhout *et al.* 2001).

É importante continuar a aprofundar, de forma integrada, a filogenia de *C. neoformans* para melhor compreender diferenças de patogenicidade, virulência e resistência a fármacos. A detecção de possíveis estirpes híbridas entre isolados dos diferentes grupos taxonômicos suscitou a hipótese de poder haver hibridação para além da reprodução clonal e que daquela poderiam resultar estirpes com novos fenótipos de virulência e de resistência (Boekhout *et al.* 2001).

5.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA CRIPTOCOCOSE

Como é geralmente reconhecido, e foi demonstrado no presente trabalho, os testes fenotípicos utilizados na identificação de leveduras, para além de serem lentos e laboriosos, não são suficientemente sensíveis na diferenciação de espécies e, por maioria de razão, de grupos dentro da própria espécie.

Nesta última década, a utilização cada vez mais difundida de métodos moleculares na caracterização e identificação de microrganismos também se reflectiu nas leveduras patogénicas e, em particular, em *C. neoformans*. Muito embora, de uma forma global, as técnicas provassem ser de fácil execução e muito rápidas na obtenção de resultados revelaram, por sua vez, diferentes graus de sensibilidade na capacidade de distinguir espécies ou estirpes.

Propusemo-nos avaliar a validade e utilidade de um método já descrito quando aplicado à identificação de isolados clínicos em rotina. Tanto a amplificação por PCR de fragmentos do rDNA utilizando um *primer* específico para *C. neoformans* como a sequenciação da região D1/D2 do gene da subunidade 26S do RNA ribossómico possibilitaram a diferenciação dos isolados de *C. neoformans* em relação a outras leveduras patogénicas e não-patogénicas, mesmo em relação às espécies filogeneticamente próximas. Qualquer dos métodos não possibilitou, no entanto, diferenciar as variedades desta espécie (Tabela 5.2). O método, já tradicional, de determinação da complementaridade genómica permitiu distinguir a variedade *neoformans* da variedade *gattii*.

A identificação molecular de *C. neoformans* com o *primer* específico, por PCR, indicou que as estirpes CN 15 e CN 71 não pertenciam a esta espécie, pois não deram origem ao

aparecimento de uma banda de 200 pb. Os testes fisiológicos convencionais (*kit* ID 32C[®], BioMérieux) tinham-nas identificado como *C. neoformans*. A análise das características não-convencionais tinha dado resultados confusos e pouco conclusivos: o isolado CN 15 tinha dado um sinal francamente positivo no teste CGB sugerindo tratar-se da var. *gattii* de *C. neoformans*, embora o teste da urease tenha dado negativo; o isolado CN 71 tinha também apresentado um teste CGB nitidamente positivo, embora não tivesse melanizado. Os métodos utilizados na validação da identificação por PCR explicaram, em seguida, os resultados descritos. A determinação da % mol G+C permitiu confirmar que a estirpe CN 15 era uma levedura ascomiceta e a análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene da subunidade 26S do RNA ribossómico levou-nos à identificação correcta das duas estirpes como *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* (CN 15) e *Cryptococcus albidus* (CN 71).

No conjunto das estirpes de *C. neoformans* analisadas, surgiram duas (CN 112 e PYCC 5025) com uma discrepância maior, embora pequena, na sequência da região D1/D2 do gene do rRNA 26S. Parece, pois, poder existir uma maior variabilidade do que a actualmente reconhecida entre estirpes de uma mesma espécie.

O estudo dos polimorfismos de regiões microssatélites (MS-PCR) permitiu avaliar mais pormenorizadamente a variabilidade intraspecífica de *C. neoformans*. Com a aplicação desta metodologia não só se obteve a separação dos dois serotipos A e D de *C. neoformans* em dois grupos distintos, como também permitiu detectar polimorfismos ao nível das estirpes incluídas no mesmo grupo (CN 100 / CN 118 / CN 123, Fig. 3.8). Através deste método foi possível ter fortes suspeitas de que diferentes isolados do mesmo doente, provenientes de diferentes infecções recidivantes, correspondiam à reinfecção pela mesma estirpe (Fig. 3.10).

O estudo dos polimorfismos de restrição de regiões variáveis (IGS) do DNA ribossómico amplificadas por PCR, para além da diferenciação nítida das duas variedades, facultou ainda a distinção entre as estirpes dos serotipos A e D de *C. neoformans*, separando-as em dois grupos claramente distintos.

É de realçar alguns aspectos singulares evidenciados pela estirpe PYCC 5028, identificada como *C. neoformans* var. *gattii* por reassociação DNA-DNA. Apresenta, em relação às estirpes da mesma variedade, um padrão diferente na actividade proteolítica, nos perfis electroforéticos dos produtos de MS-PCR e nos polimorfismos de restrição da região

IGS do rDNA. No entanto, a sequência do fragmento D1/D2 do rDNA 26S coincide com a obtida para as estirpes da var. *neoformans*.

Em síntese, as técnicas moleculares permitiram diagnosticar com fiabilidade os isolados de *C. neoformans*. As experiências de reassociação DNA-DNA forneceram informações sobre a falta de conspecificidade de estirpes suspeitas de uma identificação incorrecta. De todas as técnicas moleculares aplicadas na caracterização das estirpes analisadas, foram aquelas que se baseiam na reacção de PCR que se revelaram mais rápidas e mais facilmente exequíveis. Em termos de custos, o reagente mais dispendioso utilizado nesta técnica de PCR é a polimerase de DNA mas, contrariamente ao observado por Fell (1995), a reacção funciona bem com polimerases mais económicas. Em relação ao equipamento, a aplicação desta técnica requer a utilização de um termociclador, aparelho que já existe num grande número de laboratórios em virtude da técnica de PCR estar cada vez mais vulgarizada no diagnóstico microbiológico.

5.3. AVALIAÇÃO DIRECTA DA PRESENÇA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Para alcançar o principal objectivo deste trabalho, e na sequência do reconhecimento da potencial utilidade do método baseado em PCR para implementação num laboratório de microbiologia clínica, foram ensaiados dois métodos para a identificação directa de *C. neoformans* em amostras clínicas sem necessidade de isolar a levedura em cultura. Para este efeito houve o cuidado de seleccionar técnicas que fossem facilmente exequíveis em qualquer laboratório de diagnóstico de apoio à clínica, principalmente em laboratórios onde o volume de análises diárias é muito elevado, como no caso dos laboratórios hospitalares. Por outro lado, para que a adopção destas novas metodologias seja vantajosa em relação às actuais, foi necessário seleccionar aquelas que permitissem um diagnóstico sensível, específico, rápido na obtenção da resposta e pouco dispendioso.

Os métodos utilizados para a detecção directa de *C. neoformans* foram a amplificação por PCR do fragmento específico do rDNA e a hibridação *in situ* com uma sonda específica fluorescente dirigida para o RNA ribossómico.

A aplicabilidade das duas técnicas foi primeiro estudada a partir de amostras clínicas artificialmente infectadas com quantidades definidas de células de *C. neoformans*. Verificou-se que o método baseado em PCR permite detectar, com um elevado índice de sensibilidade, a presença de um número muito baixo de células (cerca de 10/ml) na amostra. Paralelamente, a infecção *in vitro* do mesmo tipo de amostras com células de outras leveduras, tanto de espécies de importância clínica como de outras espécies filogeneticamente próximas, confirmou a especificidade de ambos os métodos. Os produtos biológicos seleccionados para este estudo foram de natureza idêntica aos que habitualmente são recebidos no laboratório para diagnóstico da criptococose, a fim de estudar a possível acção de inibidores relativamente às técnicas aplicadas. Por último, foi confirmada a capacidade de, por aplicação do método utilizando PCR, detectar *C. neoformans* directamente a partir de amostras clínicas naturalmente infectadas.

O sucesso da detecção por PCR depende, em grande parte, da obtenção de uma quantidade suficiente de DNA de *C. neoformans* para que ocorra a reacção, pois a cápsula polissacarídea e a parede celular constituem obstáculos no acesso ao DNA. O problema maior reside nos casos em que na amostra está presente um número muito reduzido de células. É nestas situações que o método de extracção do DNA é crítico. Este passo imprescindível é o que torna esta metodologia mais laboriosa e demorada no caso específico de *C. neoformans*. Para além do mais, é também preciso ter em conta a acção de substâncias que inibam a reacção de PCR, eventualmente presentes em amostras provenientes de doentes em situações patológicas muito graves. Este é um dos aspectos que não foi analisado neste trabalho e necessita de ser futuramente pesquisado. No entanto, e apesar das restrições, o êxito do método indica-o para substituir, com grandes vantagens, as actuais técnicas de diagnóstico (exame directo e cultura).

As maiores limitações da técnica de hibridação *in situ*, utilizando uma sonda fluorescente específica dirigida para o RNA ribossómico de *C. neoformans*, relacionam-se com a selecção da sequência-alvo, a optimização das condições para uma hibridação específica com esta levedura e a existência de um microscópio de epifluorescência equipado com um jogo de filtros adequado ao fluorocromo escolhido para marcação da sonda. O desenho da sonda e consequente especificidade da sequência-alvo do rRNA e a acessibilidade da mesma à sonda são igualmente aspectos críticos desta técnica. Porém, uma vez estas questões ultrapassadas, o método é fácil de executar, sensível e potencialmente muito interessante para ser implementado em qualquer laboratório pois também proporciona uma resposta muito rápida e segura. Na Tabela 5.3 é feita uma

comparação, de uma forma sintética e semi-quantitativa, das características dos métodos utilizados na detecção directa de *C. neoformans* em amostras clínicas.

Tabela 5.3 - Comparação das principais características dos métodos utilizados neste trabalho para a detecção directa de *Cryptococcus neoformans* em amostras clínicas.

Método	Sensibili- dade	Especifici- dade	Reprodutibi- lidade	Rapidez de Resposta	Facilidade de Execução	Custo ^a
Produto de amplificação específico (PCR)	++	+++	+++	++	++	+
Hibridação <i>in situ</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+

^a Exclui o equipamento necessário (termociclador ou microscópio de epifluorescência).

Vale a pena salientar que os dois métodos são complementares, pois a hibridação *in situ* permite observar células, avaliar a presença de outros microrganismos e ter uma noção da densidade celular, aspectos em que falha o método baseado em PCR. No entanto, este último permite um desenvolvimento associado à automação do processo, através da produção de microplacas que contenham a sonda específica marcada e fixada, para uma hibridação directa com o DNA extraído da amostra clínica. O trabalho já realizado permite que esta perspectiva possa ser concretizada a curto prazo.

5.4. PERSPECTIVAS FUTURAS

A realização deste trabalho permitiu alargar de uma forma muito ampla as perspectivas de diagnóstico em micologia clínica. Neste momento, tanto quanto é do nosso conhecimento e nomeadamente no nosso País, o diagnóstico das infecções fúngicas sistémicas continua a ser feito segundo metodologias clássicas, lentas na resposta e muito pouco sensíveis, com pouca utilidade para uma clínica médica cada vez mais exigente em termos de rapidez e sensibilidade de resultados.

São os laboratórios de microbiologia de unidades hospitalares com serviços de infecciologia os potenciais interessados na utilização de novos métodos de diagnóstico da criptococose e de outras infecções causadas por leveduras e fungos em geral. Em consequência deste trabalho, um dos objectivos futuros a atingir é a implementação, nesses

laboratórios, das técnicas moleculares desenvolvidas, sendo para tal necessário padronizar a metodologia de forma a poder ser executada por pessoal técnico.

Os resultados obtidos na análise da variabilidade intraspecífica de *C. neoformans* apontam para a possibilidade de realizar estudos epidemiológicos com base na técnica de MS-PCR que se revelou útil na diferenciação de estirpes. Esta técnica também poderá ser valiosa na avaliação da evolução ao longo do tempo de infecções intermitentes no mesmo doente, permitindo detectar se são consequência de uma reinfecção da mesma estirpe ou se a recidiva resulta da infecção por uma estirpe diferente. Esta análise poderá ter importância clínica, possibilitando a avaliação de variações nos padrões de virulência e/ou resistência a fármacos antifúngicos que, com frequência, se observam *in vivo*.

As sequências específicas que constituem a base de ambos os métodos de detecção directa utilizados neste trabalho para *C. neoformans* não têm necessariamente de se restringir ao DNA/RNA ribossómico, embora não seja de menosprezar as enormes vantagens que estas moléculas oferecem. É concebível que, alargados os horizontes com a sequenciação do genoma de *C. neoformans* que já se encontra, em grande parte, disponível em bases de dados públicas, outros genes de interesse ou regiões do DNA sejam considerados para estudos com objectivos semelhantes ao nosso ou complementares. São particularmente interessantes os genes que se relacionam com a virulência desta levedura e sua interacção com o hospedeiro. Actualmente, vários grupos internacionais reunidos num grupo multicêntrico, o *Cryptococcus neoformans Genome Project*, se concentram na sequenciação do genoma completo de *C. neoformans* com o objectivo de estudar a sua estrutura, a diversidade populacional desta levedura e a diferenciação nucleotídica entre os serotipos A e D. Estão a ser estudadas duas estirpes de *C. neoformans* var. *neoformans* (JEC20, serotipo D, *Mata* e JEC21, serotipo D, *Mat α*) e uma estirpe de *C. neoformans* var. *grubii* (H99 serotipo A *Mat α*). Estima-se que as dimensões totais dos genomas sejam de cerca de 24 Mb para JEC20 e JEC21 e de 18 Mb para H99 (www.resgen.com/products/CryptoBAC.php3).

Por último, e tendo em conta a sua sensibilidade, simplicidade e reprodutibilidade, os métodos moleculares desenvolvidos neste trabalho abrem igualmente amplas perspectivas de diagnóstico de outras leveduras ou de fungos de interesse clínico em geral, não só os já reconhecidos como tal, mas também os de espécies emergentes incluindo, eventualmente, espécies até agora não cultiváveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAN, M., MATHEWS, V., GANESH, A., JOHN, J., MATHEWS, M.S. 1997. Infection caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B in an AIDS patient in India. *J. Med. Vet. Mycol.*, **35**: 283-284.
- AHEARN, D.G., MEYERS, S.P., NICOLS, R.A. 1968. Extracellular proteinases of yeasts and yeast-like fungi. *Appl. Microbiol.* **16**: 1370-1374.
- AJELLO, L. 1956. Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. *Science* **123**: 876-879.
- AJELLO, L. 1958. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. *Am. J. Hyg.* **67**: 72-77.
- AJELLO, L., MANTOVANI, A., MAZZONI, A. 1967. La criptococcosi nell'uomo. *Parassitologia* **9**:1-67.
- AL-DOORY, Y. 1971. The ultrastructure of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* **9**:113-118.
- AMANN, R., LUDWIG, W. 2000. Ribossomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 555-565.
- AMANN, R., BINDER, B.J., OLSON, R.J., CHISHOLM, S.W., DEVEREUX, R., STAHL, D.A. 1990a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.
- AMANN, R., KRUMHOLZ, L., STAHL, D.A. 1990b. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in Microbiology. *J. Bacteriol.* **172**: 762-770.
- AMANN, R., LIN, C., KEY, R., MONTGOMERY, L., STAHL, D.A. 1992. Diversity among *Fibrobacter* isolates: towards a phylogenetic classification. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 23-31.
- AMANN, R., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- ANSHENG, L., NISHIMURA, K., TAGUCHI, H., TANAKA, R., SHAOXI, W., MIYAJI, M. 1993. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. *Mycopathologia* **124**: 1-5.
- AOKI, S., ITO-KUWA, S., NAKAMURA, K., KATO, J., NINOMIYA, K., VIDOTTO, V. 1994. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **128**: 143-150.
- ARSIC, V. 2000. Sample reveals AIDS patients most at risk for cryptococcosis. *Mycology Observer* **9**: 5.
- AULAKH, H.S., STRAUSS, S.E., KWON.CHUNG, K.J. 1981. Genetic relatedness of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) and *Filobasidiella bacillispora* (*Cryptococcus bacillisporus*) as determined by deoxyribonucleic acid base composition and sequence homology studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**: 97-103.
- BAN, N., NISSEN, P., HANSEN, J., MOORE, P., STEITZ, T.A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4Å resolution. *Science* **289**: 905-920.
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W., YARROW, D. 2000. Yeasts, Characteristics and Identification. 3rd ed. Cambridge, U.K.
- BARÓ, T., TORREZ-RODRIGUEZ, J.M., MENDOZA, M.H., MORERA, Y., ALIA, C. 1998. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 458-461.
- BATCHELOR, B. BRINDLE, R., WAIYAKI, P. 1994. Clinical isolates of HIV-associated cryptococcosis in Nairobi, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 85.
- BAUWENS, L., SWINNE, D., DE VROEY, C., DE MEURICHY, W. 1986. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. *Mykosen* **29**: 291-294.
- BAVA, A.J., NEGRONI, R., BIANCHI, M. 1993. Cryptococcosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**: 87-89.

- BEMIS, D.A., KRAHWINKEL, D.J., BOWMAN, L.A., MONDON, P., KWON-CHUNG, K.J. 2000. Temperature sensitive strain of *C. neoformans* producing hyphal elements in a feline nasal granuloma. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 926-928.
- BENHAM, R.W. 1934. The fungi of blastomycosis and coccidioidal granuloma. *Arch Dermatol. Syph.* **30**: 386-400.
- BENHAM, R.W. 1935. Cryptococci, their identification by morphology and serology. *J. Infect. Dis.* **57**: 255-274
- BENHAM, R.W. 1950. Cryptococcosis and blastomycosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **50**: 1299-1314.
- BENNETT, J.E., KWON-CHUNG, K.J., HOWARD, D. 1977. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* **105**: 582-586.
- BENNETT, J.E., KWON-CHUNG, K.J., THEODORE, T.S. 1978. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* **16**: 167-174.
- BERGMAN, E. 1965. Studies on capsule synthesis of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* **4**: 23-31.
- BETTOLI, V., VIRGILI, A., ZAMPINO, M.R., BEDETTI, A., MONTANARI, P. 1993. Cutaneous cryptococcosis in AIDS: succesfull treatment with itraconazole. *Mycoses* **36**: 433-435.
- BEYT, B.E., WALTMAN, S.R. 1978. Cryptococcal endothelmitis after corneal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **298**: 825-826.
- BHATTACHARJEE, A.K., BENNETT, J.E., GLAUDEMANS, C.P.J. 1984. Capsular Polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.* **6**: 619-624.
- BLEVINS, L.B., FENN, J., SEGAL, H., NEWCOMB-GAYMAN, P., CARROLL, K.C. 1995. False-positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1674-1675.
- BOEKHOUT, T., SCORZETTI, G. 1997. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**: 147-149.
- BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SAMPAIO, J.R., GOLUBEV, W.I. 1993. Classification of heterobasidiomycetous yeasts: characteristics and affiliation of genera to higher taxa of heterobasidiomycetes. *Can. J. Microbiol.* **39**: 276-290.
- BOEKHOUT, T., THEELEN, B., DIAZ, M., FELL, J.W., HOP, W.C., ABELN, E.C., DROMER, F., MEYER, W. 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **147**: 891-907.
- BOEKHOUT, T., VAN BELKUM, A., LEENDERS, A.C., VERBRUGH, H.A., MUKAMURANGWA, P. SWINNE, D., SCHEFFERS W.A. 1997. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 432-442.
- BOLANO, A., STINCHI, S., PREZIOSI, R., BISTONI, F., ALLEGRUCCI, M., BALDELLI, F., MARTINI, A., CARDINALI, G. 2001. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* **1422**: 1-4.
- BOTARD, R.W., KELLEY, D.C. 1969. A survey to determine the occurrence of *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* in air conditioners. *Mycopathologia* **37**: 372-376.
- BOTTONE, E.J., KIRSCHNER, P.A., SALKIN, I.E. 1986. Isolation of highly encapsulated *Cryptococcus neoformans* serotype B from a patient in New York City. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 186-188.
- BOTTONE, E.J., SALKIN, I., HURD, N., WORMSER, G.P. 1987. Serogroup distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **156**: 242.
- BOTTONE, E.J., TOMA, T., JOHANSSON, B.E., WORMSER, G.P. 1985. Capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* in AIDS patients. *Lancet* **16**: 400.
- BRANDT, E.M., PINNER, R.W., BRAGG, S.L. 1993. Multilocus enzyme typing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2819-2823.

- BRAZEAU, D., CLARK, G. 2000. DNA forensic workshop protocol. *In* Principles of DNA Forensics. Module I. Interdisciplinary Centre for Biotechnology Research. University of Florida. Florida.
- BRITTEN, R.J., KOHNE, D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* **161**: 529-540.
- BRITTEN, R.J., PAVICH, M., SMITH, J. 1970. A new method for DNA purification. *Carnegie Institute of Washington Year Book* **68**: 400-402.
- BRUATTO, M., VIDOTTO, V., MAINA, A.M. 1992. Growth of *Cryptococcus neoformans* in thiamine-free media. *Mycopathologia* **119**: 129-132.
- BRUESKE, C.H. 1986. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 631-633.
- BULMER, G.S. 1990. Twenty five years with *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **109**: 111-122.
- BUSCHKE, A. 1895. Ueber eine durch coccidien hervorgerufene krankheit des menschen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **3**: 14.
- BUSSE, O. 1894. Ueber parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung. *Zentralbl. Bakteriol. Int. J. Med. Microbiol.* **16**: 175-180.
- BUSSE, O. 1895. Ueber Saccharomycosis hominis. *Virchows. Arch.* **140**: 23-46.
- CAMERON, M.L., BARTLE, J.A., GALLIS, H.A., WASKIN, H.A. 1991. Manifestation of pulmonary cryptococcosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 64-67.
- CARTER, H.S., YOUNG, J.L. 1950. Note on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from a sample of milk. *J. Pathol. Bacteriol.* **62**: 271-273.
- CASADEVALL, A., PERFECT, J.R. 1998. *Cryptococcus neoformans*, ASM Press Books, Washington.
- CASADEVALL, A., FREUNDLICH, L.A., MARSH, L., SCHARFF, M.D. 1992a. Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1080-1084
- CASADEVALL, A., MUKHERJEE J., DEVI S.J.N., SCHNEERSON R., ROBBINS J.B., SCHARFF M.D. 1992b. Antibodies elicited by a *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection. *J. Infect. Dis.* **165**: 1086-1093.
- CASADEVALL, A., ROSAS, A.L., NOSANCHUCK, J.D. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 354-358.
- CASTAÑÓN-OLIVARES, L.R., LÓPEZ-MARTINEZ, R. 1994. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses* **37**: 325-327.
- CASTAÑÓN-OLIVARES, L.R., LÓPEZ-MARTINEZ, R., BARRIGA-ANGULO, G., RIOSROSAS, C. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient: first observation in Mexico. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**: 57-59.
- CAZIN, J., KOZEL, T.R., LUPAN, D.M., BURT, W.R. 1969. Extracellular deoxyribonuclease production by yeasts. *J. Bacteriol.* **100**: 760-762.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION IN ATLANTA 2000. Study indicates cryptococcosis mortality at 10% - Infectious Disease Society of America's Annual Meeting. *Mycology Observer* **9**: 8.
- CERVANTES, R.A., SEGUNDO, C., SALAS, E. 1993. Study on varieties of *C. neoformans* isolated from clinical cases in Mexico. 2nd International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, P2-7, Milano, Italy.
- CHANG, Y.C., KWON-CHUNG K.J. 1994. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4912-4919.
- CHANG, Y.C., KWON-CHUNG K.J. 1998. Isolation of the third capsule-associated gene *CAP60* required for virulence in *C. neoformans*. *Infect. Immun.* **66**: 2230-2236.

- CHANG, Y.C., KWON-CHUNG K.J. 1999. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, *CAP10*, of *C. neoformans*. *J. Bacteriol.* **181**: 5636-5643.
- CHANG, Y., CHERNIAK, R., KOZEL, T., GRANGER, D., MORRIS, L., WEINHOLD, L., KWON-CHUNG, K. 1997. Structure and biological activities of acapsular *C. neoformans* 602 complemented with the *CAP64* gene. *Infect. Immun.* **65**: 1584-1595.
- CHANG, Y.C., PENOYER, L.A., KWON-CHUNG, K.J. 1996. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, *Cap64*, is essential for virulence. *Infect. Immun.* **64**: 1977-1983.
- CHASKES, S., TYNDALL, R.L. 1975. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from *para*- and *ortho*-diphenols: effect of the nitrogen source. *J. Clin. Microbiol.* **1**: 509-514.
- CHASKES, S., TYNDALL, R.L. 1978. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. *J. Clin. Microbiol.* **7**: 146-152.
- CHATUVERDI, S., RODEGHIER, B., FAN, J., McCLELLAND, C., WICKES, B., CHATUVERDI, V. 2000. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* *Mat α* and *Mat a* pheromones to determine mating type, ploidy and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2007-2009.
- CHEN, F., CURRIE, B.P., CHEN, L.C., SPITZER, S.G., SPITZER, E.D., CASADEVALL, A. 1995. Genetic relatedness of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates grouped with the repetitive DNA probe *CNRE-1*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2818-2822.
- CHEN, L., BLANK, E., CASADEVALL, A. 1996a. Extracellular proteinase activity of *C. neoformans*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **3**: 570-574.
- CHEN, L., PIROFSKI, L., CASADEVALL, A. 1997a. Extracellular proteins of *C. neoformans* and host antibody response. *Infect. Immun.* **65**: 2599-2605.
- CHEN, S.C.A., BROWNLEE, A.G., SORRELL, T.C., RUMA, P., ELLIS, D.H., PFEIFFER, T., SPEED, B.R., NIMMO, G. 1996b. Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS or other immunosuppressive conditions. *J. Infect. Dis.* **173**: 754-758.
- CHEN, S.C.A., MULLER, M., ZHOU, J.Z., WRIGHT, L., SORRELL, T.C. 1997b. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J. Infect. Dis.* **175**: 414-420.
- CHEN, S.C.A., WRIGHT, L.C., SANTANGELO, R.T., MULLER, M., MORAN, V.R., KUCHEL, P.W., SORRELL, T.C. 1997c. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **65**: 405-411.
- CHEN, Y.C., EISNER, J.D., KATTAR, M.M., RASSOULIAN-BARRETT, S.L., LAFE, K., YARFITZ, S.L., LIMAYE, A.P., COOKSON, B.T. 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2302-2310.
- CHERNIAK, R., SUNDSTROM, J.B. 1994. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **62**: 1507-1512.
- CHERNIAK, R., MORRIS, L., ANDERSON, B.C., MEYER, S.A. 1991. Facilitated isolation, purification and analysis of glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **59**: 59-64.
- CHERNIAK, R., MORRIS, L., BELAY, T., SPITZER, E., CASADEVALL, A. 1995. Variation in the structure of glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. *Infect. Immun.* **63**: 1899-1905.
- CHUCK, S.L., SANDE, M.A. 1989. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Eng. J. Med.* **321**: 794-799.

- COGLIATI, M., ALLARIA, M., TORTORANO, A.M., VIVIANNI, M.A. 2000. Genotyping *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* with specific primers designed from PCR-fingerprinting bands sequenced using a modified PCR-based strategy. *Med. Mycol.* **38**: 97-103.
- CONANT, N.F., MARTIN, D.S., SMITH, D.T., BAKER, R.D., CALLAWAY, J.L. 1944. Manual of Clinical Mycology. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- CONNOLLY, J.H., KROCKENBERGER, M.B., MALIK, R., CANFIELD, P.J., WIGNEY, D.I., MUIR, D.B. 1999. Assymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Med. Mycol.* **37**: 331-338.
- COX, G.M., DADE, H., CHEN, S., TUCKER, S., GOTTFREDSSON, M., WRIGHT, L., SORRELL, T., LEIDICH, S., CASADEVALL, A., GRANNOUM, M., PERFECT, J. 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **39**: 166-175.
- COX, G.M., MUKHERJEE, J., COLE, G.T., CASADEVALL, A., PERFECT, J.R. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* **68**: 443-448.
- CRISEO, G., GALLO, M. 1997. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental and clinical sources in extreme southern Italy (Calabria and Sicily, central Mediterranean area). *Mycoses* **40**: 95-100.
- CRONE, J.T., DeGROAT, A.F., WAHLIN, J.G. 1937. Torula infection. *Am. J. Pathol.* **13**: 863-879.
- CURRIE, B.P., CASADEVALL, A. 1994. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among HIV infected individuals in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 1029-1033.
- CURRIE, B.P., FREUNDLICH, L.F., CASADEVALL, A. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1188-1192.
- CURRIE, B.P., VIGUS, T., LEACH, G., DWYER, B. 1990. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Lancet* **336**: 1442.
- CURTIS, F. 1895. Note sur un nouveau parasite humain, *Megalococcus myxoides* trouvé dans un néoplasme de la région inguino-crurale. *C. R. Soc. Biol.* **1895**: 715-718.
- CUTLER J.E., ERKE, K.H. 1971. Ultrastructural characteristics of *Coccidioides immitis*, a morphological variant of *Cryptococcus neoformans* and *Podosypha ravenelii*. *J. Bacteriol.* **105**: 438-444.
- DE BERNARDIS, F., MONDELLO, F., SCARAVELLI, G., PACHI, A., GIROLAMO, A., AGATENSI, L., CASSONE, A. 1999. High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1376-1380.
- DE LEY, J., CATTOIR, H., REYNAERTS, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**: 133-142.
- DE LONG, E., TAYLOR, L., MARSH, T., PRESTON, C. 1999. Visualization and enumeration of Marine Planktonic Archaea and Bacteria by using poliribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5554-5563.
- DE LONG, E., WICKHAM, G., PACE, N. 1989. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**: 1360-1363.
- DENNING, D.W., ARMSTRONG, R.W., LEWIS, B.H., STEVENS, D.A. 1991. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis. *Am. J. Med.* **91**: 267-272.
- DENTON, J.E., DI SALVO, A.E. 1968. The prevalence of *Cryptococcus neoformans* in various natural habitats. *Sabouraudia* **6**: 213-217.
- DEVI, S., REDDY, P., LYMAN, C., WALSH, T., FRASCH, C., BUSH, A. 1996. Immunochemical properties of a polysaccharide antigen of *Trichosporon beigelii* that cross-reacts with the capsular glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Immunol. Infect. Dis.* **6**: 87-92.

- DIAZ, M.R., BOEKHOUT, T., THEELEN, B., FELL, J.W. 2000. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *System. Appl. Microbiol.* **23**: 535-545.
- DIAZ, M.R., FELL, J.W. 2000. Molecular analyses of the IGS & ITS regions of DNA of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**: 7-12.
- DISMUKES, W. 1988. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **157**: 624-628.
- DONG H., COURCHESNE, W. 1998. A novel quantitative mating assay for the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* provides insight into signalling pathways responding to nutrients and temperature. *Microbiology* **144**: 1691-1697.
- DONG, Z.M., MURPHY, J.W. 1995. Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infect. Immun.* **63**: 2632-2644.
- DROMER, F., GUÉHO, E., RONIN, O., DUPONT, B., 1993. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 359-363.
- DROMER, F., MATHOULIN, S., DUPONT, B., LAPORTE, A., and the French Cryptococcosis Study Group 1996a. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 82-90.
- DROMER, F., MATHOULIN, S., DUPONT, B., LETENNEUR, L., RONIN, O., and the French Cryptococcosis Study Group 1996b. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. French Cryptococcosis Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 91-96.
- DROMER, F., RONIN, O., DUPONT, B. 1992. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 395-397.
- DROMER, F., SALAMERO, J., CONTREPOIS, A., CARBON, C., YENI, P. 1987. Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* **55**: 742-748.
- DROMER, F., VARMA, A., RONIN, O., MATHOULIN, S., DUPONT, B. 1994. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2364-2371.
- DUARTE, A., ORDONES, N., CASTANEDA, E. 1994. Asociación de levaduras del género *Cryptococcus* con especies de *Eucalyptus* en Santafé de Bogotá. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **36**: 125-130.
- DUFAIT, R., VELHO R., DeVROEY C. 1987. Rapid identification of the two varieties of *C. neoformans* by D-proline assimilation. *Mycoses* **30**: 483.
- DYKSTRA, M. A., FRIEDMAN, L., MURPHY, J. W. 1977. Capsule size of *Cryptococcus neoformans*: control and relationship to virulence. *Infect. Immun.* **16**: 129-135.
- ECKERT, T.E, KOZEL, T.R. 1987. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* **55**: 1895-1899.
- EDBERG, S.C., CHASKES, S.J., ALTURE-WERBER, E. SINGER, J.M. 1980. Esculin-based medium for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **12**: 332-335.
- EDMAN, J.C., KWON-CHUNG, K.J. 1990. Isolation of the *URA5* gene from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and its use as a selective marker for transformation. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4538-4544.
- EGGERT, C., TEMP, U., ERICKSSON, K.-E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1151-1158.
- ELLIS, D.H. 1987. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 430-431.
- ELLIS, D.H. 1994. Clinical Mycology. The human opportunistic mycoses. Underdale, Australia
- ELLIS, D.H., PFEIFFER T.J. 1990a. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* **336**: 923-925.

- ELLIS, D.H., PFEIFFER, T.J. 1990b. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1642-1644.
- ELLIS, D.H., PFEIFFER, T.J. 1992. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Epidemiol.* **8**: 321-325.
- EMMONS, C.W. 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J. Bacteriol.* **62**: 685-690.
- EMMONS, C.W. 1952. *Cryptococcus neoformans* strains from a severe outbreak of bovine mastitis. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **6**: 231-234.
- EMMONS, C.W. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg.* **62**: 227-232.
- EMMONS, C.W. 1960. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Public Health Rep.* **75**: 362-364.
- EMMONS, C.W., BINFORD, C., UTZ, J.P., KWON-CHUNG, K.J. 1977. Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia.
- ENGLER, H.D., SHEA, Y.R. 1994. Effect of potential interference factors on performance of enzyme immunoassay and latex agglutination assay for cryptococcal antigen. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2307-2308.
- ERKE, K.H. 1976. Light microscopy of basidia, basidiospores, and nuclei in spores and hyphae of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). *J. Bacteriol.* **128**: 445-455.
- ERKE, K.H., SCHNEIDAU, J.D. 1973. Relationship of some *Cryptococcus neoformans* hypha-forming strains to standard strains and to other species of yeasts as determined by deoxyribonucleic acid bases and homologies. *Infect. Immun.* **7**: 941-948.
- EVANS, E.E. 1949. An immunologic comparison of twelve strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **71**: 644-646.
- EVANS, E.E. 1950. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I: A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J. Immunol.* **60**: 423-430.
- EVANS, E.E. 1959. Reaction of an *Aspergillus* polysaccharide with *Cryptococcus* capsules and various acidic polysaccharides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **101**: 760-762.
- EVANS, E.E. 1960. Capsular reactions of *Cryptococcus neoformans*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **89**: 184-192.
- EVANS, E.E., KESSEL, J.F. 1951. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. II. Serologic studies with the capsular polysaccharide. *J. Immunol.* **67**: 109-114.
- EVERTSSON, U., MONSTEIN, H., JOHANSSON, A. 2000. Detection and identification of fungi in blood using broad-range 28S rDNA PCR amplification and species-specific hybridisation. *APMIS* **108**: 385-392.
- FAGGI, E., GARGANI, G., PIZZIRANI, C., PIZZIRANI, S., SAPONETTO, N. 1993. Cryptococcosis in domestic mammals. *Mycoses* **36**: 165-170.
- FAN, M., CHEN L.C., RAGAN M. A., GUTELL R.R., WARNER J.R., CURRIE B.P., CASADEVALL 1995. The 5S rRNA intergenic spacer of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**: 215-221.
- FAN, M., CURRIE, B.P., GUTELL, R.R., RAGAN, M.A., CASADEVALL, A. 1994. The 16S-like, 5.8S and 23S-like rRNAs of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*: sequence, secondary structure, phylogenetic analysis and restriction fragment polymorphisms. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**: 163-180.
- FARHI, F., BULMER, G.S., TRACKER, J.R. 1970. *C. neoformans* IV. The not-so-encapsulated yeast. *Infect. Immun.* **1**: 526-531.
- FARMER, S.G., KOMOROWSKI R.A. 1973. Histologic response to capsule deficient of *Cryptococcus neoformans*. *Arch. Pathol.* **96**: 383-387.
- FEDERICI, E 1982. A note on milk clotting ability in the yeast genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 293-296.

- FELL, J.W. 1995. rDNA targeted oligonucleotide primers for the identification of pathogenic yeasts in a polymerase chain reaction. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 475-477.
- FELL, J.W., BLATT, G.M. 1999. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **23**: 677-681.
- FELL, J.W., KURTZMAN, C.P. 1990. Nucleotide sequence analysis of a variable region of the large subunit rRNA for identification of marine-occurring yeasts. *Curr. Microbiol.* **21**: 295-300.
- FELL, J.W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SAMPAIO, J.P. 2001. Basidiomycetous yeasts. In *The Mycota VII Part B Systematics and Evolution*. McLaughlin, McLaughlin and Lemke (Eds.), Springer-Verlag, Berlin.
- FELL, J.W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SCORZETTI, G., STATZELL-TALLMAN, A. 2000a. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1351-1371.
- FELL, J.W., DIAZ, M., SCORZETTI, G., STATZELL-TALLMAN, A. 2000b. Molecular systematics of basidiomycetous yeasts. Book of Abstracts pp.73-74. Tenth International Symposium on Yeasts, Arnhem, Netherlands.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.
- FISHER, D., BURROW, J., LO, D., CURRIE, B. 1993. *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia: predominantly variant *gattii* with good outcomes. *Aust. N. Z. Med.* **23**: 678-682.
- FOX, G.E., WISOTZKEY, J.D., JURTSOK, JR, P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 166-170.
- FRANZOT, S.P., FRIES, B.C., CLEARE, W., CASADEVALL, A. 1998a. Genetic relationship between *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* strains of serotypes A and D. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2200-2204.
- FRANZOT, S.P., MUKHERJEE, J., CHERNIAK, R., CHEN, L.C., HAMDAN, J.S., CASADEVALL, A. 1998b. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect. Immun.* **66**: 89-97.
- FRANZOT, S.P., SAKLIN, I.F., CASADEVALL, A. 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 838-840.
- FREED, E.R., DUMA, R., SHADOMY, H.J., UTZ, J.P. 1991. Meningoencephalitis due to hyphae-forming *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Clin. Pathol.* **55**: 30-33.
- FREY, D., DURIE, E.B. 1964. The isolation of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*) from soil in New Guinea and pigeon droppings in Sydney, New South Wales. *Med. J. Aust.* **1**: 947-949.
- FRIES, B.C., GOLDMAN, D., CHERNIAK, R., JU, R., CASADEVALL, A. 1999. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect. Immun.* **67**: 6076-6083.
- FROMTLING, R.A., SHADOMY H.J., JACOBSON E.S. 1982a. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **79**: 23-29.
- FROMTLING, R.A., SHADOMY, S., SHADOMY, J., DISMUKES W.E. 1982b. Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in non-endemic areas. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 408-410.
- FUCHS, B.M., GLÖCKNER, F.O., WULF, J., AMANN, R. 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3603-3607.
- FUCHS, B.M., SYUTSUBO, K., LUDWIG, W., AMANN, R. 2001. In situ accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 961-968.

- FUCHS, B.M., WALLNER, G., BEISKER, W., SCHWIPPL, I., LUDWIG, W., AMANN, R. 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4973-4982.
- FUSEK, M., SMITH, E.A., MONOD, M., FOUNDLING, S.I. 1993. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. *FEBS Lett.* **327**: 108-112.
- GARCIA-HERMOSO, D., JANBON, G., DROMER, F. 1999. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3204-3209.
- GARCIA-HERMOSO, D., MATHOULIN-PÉLISSIER, S., COUPRIE, B., RONIN, O., DUPONT, B., DROMER, F. 1997. DNA typing suggests pigeon droppings as a source of pathogenic *Cryptococcus neoformans* serotype D. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2683-2685.
- GATTI, F., EECKELS, H. 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin. Part I. Description of the disease and of the strain. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **50**: 689-694.
- GEZUELE, E., CALEGARI, L., SANABRIA, D., DAVEL, G., CIVILA, E. 1993. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of wasp *Polybia occidentalis*. *Rev. Iber. Micol.* **10**: 5-6.
- GHANNOUM M.A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 122-143.
- GOLUBEV, W. 1991. Capsules, *In The Yeasts, Yeast Organelles*. A. H. Rose and J. S. Harrison (Eds.) Vol. IV (2nd ed.), pp.175-178, Academic Press, London.
- GOODLEY, J.M., HAMILTON, A.J. 1993. A novel extracellular high molecular weight proteinase from *C. neoformans*. P1-3, 2nd International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, Milano, Italy.
- GOTTFREDSSON, M., COX, G., PERFECT, J. 1998. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. *Pathology* **30**: 405-418.
- GRADE, W., HINNEFELD, S.W., BABCOCK, L.S. 1991. Comparison of the PREMIER cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the latex agglutination assay for the detection of cryptococcal antigens. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1616-1619.
- GRANGER, D.L., PERFECT, J.R., DURACK, D.T. 1985. Virulence of *Cryptococcus neoformans*: regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J. Clin. Invest.* **76**: 508-516.
- GRIMONT, P.A. 1988. Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can. J. Microbiol.* **34**: 541-546.
- GUARDET, J., JULIEN, J., LAFAY, J., BRYGOO, Y. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species as determined by large subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* **6**: 227-242.
- GUÉHO, E. 1984. DNA base composition and DNA relatedness among species of *Trichosporon* Behrend. *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 17:32.
- GUÉHO, E., MEYER, S. 1989. A revaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. *Antonie van Leeuwenhoek* **55**: 245-251.
- GUÉHO, E., de HOOG, G.S., SMITH, M. 1992a. Neotypification of the genus *Trichosporon*. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**: 285-288.
- GUÉHO, E., IMPROVISI, L., CHRISTEN, R., DE HOOG, G.S. 1993. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **63**: 175-189.
- GUÉHO, E., KURTZMAN C.P., PETERSON, S.W. 1989. Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S ribosomal RNA sequence divergence. *System. Appl. Microbiol.* **12**: 230-236.

- GUÉHO, E., SMITH, M., DE HOOG, G.S., BILLON-GRAND, G., CHRISTEN, R., BATENBURG-VAN DER VEGTE, 1992b. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**: 289-316.
- GUREVITZ, O., GOLDSCHMIED-REUVEN, A., BLOCK, C., KOPOLOVIC, J., FARFEL, Z., HASSIN, D. 1994. *Cryptococcus neoformans* vertebral osteomyelitis. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**: 315-318.
- GURRI, J. 1950. Reconocimiento de tórula histolítica (*Torulopsis neoformans*) en los cortes histológicos. *Anales Facultad Medicina* **35**: 1-8.
- GUSTIN, P.N., KELLEY, D.C. 1971. A survey of zoo aviaries for the presence of *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **45**: 93-102.
- GUTELL, R.R., FOX, G.E. 1988. A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucl. Acids Res.* **16**: r175-r269.
- HALLIDAY, C.L., BUI, T., KROCKENBERGER, M., MALIK, R., ELLIS, D.H., CARTER, D.A. 1999. Presence of α and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2920-2926.
- HAMAMOTO, M., SUJIAMA, J., KOMAGATA, K. 1987. DNA-DNA reassociation studies of strains in the genera *Rhodospiridium* and *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 57-73.
- HAMILTON, A. J., HOLDOM, M.D. 1997. Biochemical composition of the Cu, Zn superoxide dismutases of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect. Immun.* **65**: 488-494.
- HAMILTON, J.R., NOBLE, A., DENNING, D.W., STEVENS, D.A. 1991. Performance of *Cryptococcus* Antigen latex agglutination Kits on serum and cerebrospinal fluid specimens of AIDS patients before and after pronase treatment. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 333-339.
- HAYNES, K.A., SULLIVAN, D.J., COLEMAN, D.C., CLARKE, J.C., EMILIANUS, R., ATKINSON, C., CANN, K.J., 1995a. Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 99-102.
- HAYNES, K.A., WESTERNENG, T.J., FELL, J.W., MOENS, W. 1995b. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**: 319-325.
- HINRICHSSEN, S.L., TRAVASSOS, F., DUARTE, O.R., CAMPOS, C., ARAUJO, C. 1991. Meningoencefalite por *Cryptococcus neoformans*. Relato de quatro casos. *Arq. Bras. Med.* **65**: 38-41.
- HIRANO, A.S., ZIMMERMAN, H.M., LEVINE, S. 1965a. Fine structure of cerebral fluid accumulation VI. *Arch. Neurol.* **12**: 189-196.
- HIRANO, A.S., ZIMMERMAN, H.M., LEVINE, S. 1965b. Fine structure of cerebral fluid accumulation VII. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **24**: 386-396.
- HOFFMANN, S., STENDERUP, J., MATHIESEN, L. R. 1991. Low yield of screening for cryptococcal antigen by latex agglutination assay on serum and cerebrospinal fluid from Danish patients with AIDS or ARC. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**: 697-702.
- HOPFER, R.L. 1995. Use of molecular biological techniques in the diagnostic laboratory for detecting and differentiating fungi. *Archives of Medical Research* **26**: 287-292.
- HOPFER, R.L., WALDEN, P., SETTERQUIST, S., HIGHSMITH, W.E. 1993. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**: 65-75.

- HOWARD D.H. 1961. Some factors which affect the initiation of growth of *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **82**: 430-435.
- HOWARD, D. H. 1973. The commensalism of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* **11**: 171-174.
- HUAHUA, T., RUDY, J., KUNIN, C.M. 1991. Effect of hydrogen peroxide on growth of *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts in simulated blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 328-332.
- HUFFNAGLE, G.B., CHEN, G.H., CURTIS, J.L., MACDONALD, R.A., STRIETER, R.M., TOEWS, G.B. 1995. Down-regulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* **155**: 3507-3516.
- IKEDA, R., MATSUYAMA, H., NISHIKAWA, A., SHINODA, T., FUKAZAWA Y. 1991. Comparison of serological and chemical characteristics of capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A and *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Microbiol. Immunol.* **35**:125-138.
- IKEDA, R., NISHIKAWA, A., SHINODA, T., FUKAZAWA, Y. 1985. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. *Microbiol. Immunol.* **29**: 981-991.
- IKEDA, R., NISHIMURA, S., NISHIKAWA, A., SHINODA, T. 1996. Production of agglutinating monoclonal antibody against antigen 8 specific for *C. neoformans* serotype D. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **3**: 89-92.
- IKEDA, R., SHINODA, T., FUKASAWA, Y., KAUFMAN, L. 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its applications to serotyping of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 22-29.
- IKEDA, R., SHINODA, T., MORITA, T., JACOBSON, E.S. 1993. Characterization of a phenol oxidase from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Microbiol. Immunol.* **37**: 759-764.
- IMWIDHAYA, P. 1994. One year's experience with *Cryptococcus neoformans* in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 208.
- IMWIDHAYA, P., DITHAPRASOP, P., EGTASAENG, C. 1989. Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Bangkok (Thailand). *Mycopathologia* **108**: 65-67.
- ISHAQ, C.M, BULMER, G.S., FELTON, EG. 1968. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **35**: 81-90.
- JACOBSON, E.S., COMPTON, G.M. 1996. Discordant regulation of phenoloxidase and capsular polysaccharide in *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **34**: 289-291.
- JACOBSON, E.S., EMERY, H.S. 1991a. Temperature regulation of the cryptococcal phenoloxidase. *J. Med. Vet. Mycol.* **29**: 121-124.
- JACOBSON, E.S., EMERY, H.S. 1991b. Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **173**: 401-403.
- JACOBSON, E.S., TINNELL, S.B. 1993. Antioxidant function of fungal melanin. *J. Bacteriol.* **175**: 7102-104.
- JACOBSON, E.S., VARTIVARIAN, S.E. 1992. Iron assimilation in *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 443-450.
- JACOBSON, E.S., JENKINS, N.D., TODD, J.M. 1994. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infect. Immun.* **62**: 4085-4086.
- JAMES, P.D., CHERNIAK, R. 1992. Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **60**: 1084-1088.
- JEMTLAND, R., MAEHLUM, E., GABRIELSEN, O., OYEN, T. 1986. Regular distribution of length heterogeneities within non-transcribed spacer regions of cloned and genomic rDNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **14**: 5145-5158.

- JURTSHUK, R.J., BLICK, M., BLESSER, J., FOX, G.E., JURTSHUK, P. 1992. Rapid *in situ* hybridization technique using 16S rRNA segments for detecting and differentiating the closely related gram-positive organisms *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2571-2578.
- KAMINISHI, H., MIYAGUCHI, H., TAMAKI, T., SUENAGA, N., HISAMATSU, M., MIHASHI, I., MATSUMOTO, H., MAEDA, H., HAGIHARA, Y. 1995. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect. Immun.* **63**: 984-988.
- KAPLAN, W., BRAGG, S.L., CRANEL S., AHEARN, D.G. 1981. Serotyping *Cryptococcus neoformans* by immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* **14**: 313-317.
- KAUFMAN, L., BLUMER, S. 1977. Cryptococcosis: the awakening giant. Proceedings of the Fourth International conference on the Mycoses, June, PHAO Scientific Publications **356**: 176-182.
- KEMPF, V.A., TREBASIU, K., AUTENRIETH, I.B. 2000. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 830-838.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- KLIGMAN, A.M., WEIDMAN, F.D. 1949. Experimental studies on treatment of human torulosis. *Arch. Dermatol. Syph.* **60**: 726-741.
- KOHL, K.H., HOF, H., SCHRETTENBRUNNER, A., SEELIGER, H.P. 1985. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Europe. *Lancet* **i**: 1515.
- KORTH, H., PULVERER, G. 1971. Pigment formation for differentiating *Cryptococcus neoformans* from *Candida albicans*. *Appl. Microbiol.* **21**: 541-542.
- KOVACS, J.A., KOVACS, A.A., POLLS, M., WRIGHT, W.C., GILL, V.J., TUAZONE, C.U., GEJMANN, P., LANE, H.C., LONGFIELD, R., OVERTURE, G., MACHER, A.M., FAUCI, A.S., PARRILLO, J.E., BENNETT, J.E., MASUR, H. 1985. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* **103**: 533-538.
- KOZEL, T., GULLEY, W.F., CAZIN, J. 1977. Immune response to *Cryptococcus neoformans* soluble polysaccharide: Immunological unresponsiveness. *Infect. Immun.* **18**: 701-707.
- KOZEL, T.R., PFROMMER, S.T., GUERLAIN, A.S., HIGHISON, B.A., HIGHISON, G.J. 1988. Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.* **10**: S436-S439
- KREGER VAN-RIJ, N.J.W. (Ed.) 1984. The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- KRIMMER, V., MERKERT, H., VON EIFF, C., FROSCH, M., EULERT, J., LÖHR, J. F., HACKER, J., ZIEBUHR, W. 1999. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2667-2673.
- KROMMINGA, R., STAIB, F., TALMANN, U., JAUTZKE, G., SEIBOLD, M., HOCHREIN, H., WITT, H., BURGER, H. 1990. Osteomyelitis due to *Cryptococcus neoformans* in advanced age. Case report and review of literature. *Mycoses* **33**: 157-166.
- KUROKAWA, C.S., SUGIZAKI, M.F., PERAÇOLI, M.T. 1998. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **40**:125-135.
- KURTZMAN, C.P. 1998. Nuclear DNA hybridization: quantification of close genetic relationships. In The Yeasts, a Taxonomic Study. C.P. Kurtzman and J.W. Fell (Eds.), 4th ed., pp.63-68, Elsevier, Amsterdam.
- KURTZMAN, C.P. 2000. New perspectives in yeast systematics and biodiversity from gene sequence analysis. Book of Abstracts pp.71-72. Tenth International Symposium on Yeasts, Arnhem, Netherlands.
- KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. (Eds.) 1998. The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th ed. Elsevier, Amsterdam.

- KURTZMAN, C.P., PHAFF, H.J. 1987. Molecular Taxonomy. In The Yeasts, Biology of Yeasts, A.H. Rose and J. S. Harrison (Eds.), Vol. I, 2nd ed., pp. 63-94, Academic Press, London.
- KÜTZING, F. 1833. *Cryptococcus* Ktz. Alg. Aq. Dulc. Germ. *Linnaea* **8**: 365.
- KWON-CHUNG, K.J. 1975. A new genus, *Filobasidiella* the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **67**: 1197-1200.
- KWON-CHUNG, K.J. 1976a. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* **68**: 942-946.
- KWON-CHUNG, K.J. 1976b. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans* the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **68**: 821-833.
- KWON-CHUNG, K.J. 1991. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*. *Zentralbl. Bakteriol.* **275**: 390-393.
- KWON-CHUNG, K.J. 1998. *Filobasidiella* Kwon-Chung. In The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th ed., C.P. Kurtzman and J.W. Fell (Eds.), pp. 656-662, Elsevier, Amsterdam.
- KWON-CHUNG, K.J., BENNETT, J.E. 1978. Distribution of α and **a** mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am. J. Epidemiol.* **108**: 337-340.
- KWON-CHUNG, K.J., BENNETT, J.E. 1984a. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* **120**: 123-130.
- KWON-CHUNG, K.J., BENNETT, J.E. 1984b. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A* **257**: 213-218.
- KWON-CHUNG, K.J., BENNETT, J.E. 1992. Medical Mycology. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- KWON-CHUNG, K.J., CHANG, Y.C. 1994. Gene arrangement and sequence of the 5S rRNA in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) as a phylogenetic indicator. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 209-213.
- KWON-CHUNG, K.J., FELL, J.W. 1984. *Filobasidiella* Kwon-Chung. In The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd ed., N.J.W. Kreger Van-Rij (Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- KWON-CHUNG, K.J., POPKIN, T.J. 1976. Ultrastructure of septal complex in *Filobasidiella. neoformans* (*C. neoformans*). *J. Bacteriol.* **126**: 524-528.
- KWON-CHUNG, K.J., RHODES, J.C. 1996. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **51**: 218-223.
- KWON-CHUNG, K.J., BENNETT, J.E., RODES, J.C. 1982a. Taxonomic studies of *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**: 25-38.
- KWON-CHUNG, K.J., BENNETT, J.E., THEODORE, T.S. 1978. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 616-620.
- KWON-CHUNG, K.J., EDMAN, J.C., WICKES, B.L. 1992a. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **60**: 602-605.
- KWON-CHUNG, K.J., GOLDMAN, W.E., KLEIN, B., SZANISZLO, P.J. 1998. Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. *Med. Mycol.* **36** Suppl 1: 38-44.
- KWON-CHUNG, K.J., HILL, W.B., BENNETT, J.E. 1981. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 383-387.
- KWON-CHUNG, K.J., KOZEL, T.R., EDMAN, J.C., POLACHEK, I., ELLIS, D., SHINODA, T., DROMER, F. 1992c. Recent advances in biology and immunology of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 133-142.

- KWON-CHUNG, K.J., LEHMAN, D., GOOD, C., MAGEE, P.T. 1985. Genetic evidence for the role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **49**: 571-575.
- KWON-CHUNG, K.J., POLACHECK, I., POPKIN, T.J. 1982c. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J. Bacteriol.* **150**: 1414-1421.
- KWON-CHUNG, K.J., POLACHECK, I., BENNETT, J.E. 1982b. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* **15**: 535-537.
- KWON-CHUNG, K.J., VARMA, A., HOWARD, D.H. 1990. Ecology of *Cryptococcus neoformans* and prevalence of its two varieties in AIDS and non AIDS associated cryptococcosis. In *Mycoses In AIDS Patients*. H. Vanden Bossche, D. W. Mackenzie, G. Cauwenbergh, J. Van Cutsem, E. Drouhet, and B. Dupont (Eds.), pp. 103-113. Plenum Press, New York.
- KWON-GHUNG, K.J., WICKES, B.L., BOOTH, J.L., VISHNIAC, H.S., BENNETT, J.E. 1987. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **55**: 1751-1754.
- KWON-GHUNG, K.J., WICKES, B.L., STOCKMAN, L., ROBERTS, G.D., ELVIS, D., HOWARD, D.H. 1992b. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect. Immun.* **60**: 1869-1874.
- LACAZ, C.S., HEINS-VACCARI, E.M., MELO, N.T., MORENO-CARYALHO, O.A., SAMPAIO M.L., NOGUEIRA, L.S., BADARO, R.J., LIVRAMENTO, J.A. 1993. Neurocryptococcosis caused by nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Arq. Neurop.* **51**: 395-398.
- LAROCHE, R., DEPPNER, M., FLOCH, J.J., KADENDE, P., GOASGUEN, J., SAUNIERE, J.F., DUPONT, B. 1990. La criptococose a Bujumbura, Burundi. à propos de 80 cas observés en 42 mois. *Bull. Soc. Path. Ex.* **83**: 159-169.
- LATHE, R. 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J. Mol. Biol.* **183**: 1-12.
- LAURENSEN, I.F., NARAQI, S., TREVETT, A., LALLOO, D., NWOKOLO, N., MATUKA, A., OGUNBANJO, B., IGO, J., TEFURANI, N. 1993. Cryptococcal investigations in Papua New Guinea. 2nd International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. Milano, Italy, P2-10.
- LAZERA, M.S., PIRES, F.D., CAMILLO-COURA, L., NISHIKAWA, M.N., BEZERRA, C.C., TRILLES, L., WANKE, B. 1996. Natural habitat of *C. neoformans* var. *neoformans* in decaying wood-forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* **34**: 127-131.
- LAZERA, M.S., WANKE, B., NISHIKAWA, M.M. 1993. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**: 449-454.
- LEE, S.C., DICKSON, D.W., CASADEVALL, A. 1996. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications. *Hum. Pathol.* **27**: 839-847.
- LEHMANN, P.E, MORGAN R.J., FREIMER E.H. 1984. Infection with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* leading to a pulmonary cryptococcoma and meningitis. *J. Infect.* **9**: 301-306.
- LENGELER, K., WANG, P., COX, G., PERFECT, J., HEITMAN, J. 2000. Identification of the MATa mating type locus of *Cryptococcus neoformans* reveals a serotype A MATa strain thought to have been extinct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:14455-14460.
- LEVITZ, S.M. 1991. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 1163-1169.
- LI, S., SPEAR, R.N., ANDREWS, J.H. 1997. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscope slides and leaf surfaces. *App. Environ. Microbiol.* **63**: 3261-3267.

- LIAW, Y.S., YANG, P.C., YU, C.J., CHANG, D.B., WANG, H.J., LEE, L.N., KUO, S.H., LUH, K.T. 1995. Direct determination of cryptococcal antigen in transthoracic needle aspirate for diagnosis of pulmonary cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1588-1591.
- LICEA, B., GARZA, D., ZUNIGA, M. 1996. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev. Iber. Micol.* **13**: 27-28.
- LIM, E.L., AMARAL, L.A., CARON, D.A., DeLONG, E. 1993. Application of rRNA-based probes for observing marine nanoplanktonic protists. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1647-1655.
- LISCHEWSKI, A., AMANN, R.I., HARMSSEN, D., MERKERT, H., HACKER, J., MORSCHHAUSER, J. 1996. Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent in situ hybridization with an 185 rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Microbiology* **142**: 2731-2740.
- LISCHEWSKI, A., KRETSCHMAR, M., HOF, H., AMANN, R., HACKER, J., MORSCHHÄUSER, J. 1997. Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA-specific fluorescent in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2943-2948.
- LITTMAN, M.L. 1958. Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **20**: 623-648.
- LITTMAN, M.L. 1959. Cryptococcosis (Torulosis) Current concepts and therapy. *Am. J. Med.* **27**: 976-998.
- LITTMAN, M.L., BOROK, R. 1968. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopath. Mycol. Appl.* **35**: 331-345.
- LITTMAN, M.L., SCHNEIERSON, S.S. 1959. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *Am. J. Hyg.* **69**: 49-59.
- LITTMAN, M.L., TSUBURA E. 1959. Effect of degree of encapsulation upon virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **101**: 773-776.
- LODDER, J., KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 1952. The Yeasts, a Taxonomic Study. North-Holland, Amsterdam.
- LOFFLER, J., HEBART, H., SCHUMACHER, U., REITZE, H., EINSELE, H. 1997. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3311-3312.
- LURIE, H.I., SHADOMY, H.J. 1971. Morphological variations of a hypha-forming strain of *Cryptococcus neoformans* (coward strain) in tissues of mice. *Sabouraudia* **9**: 10-14.
- MACCANI, J.E. 1977. Detection of cryptococcal polysaccharide using counterimmuno-electrophoresis. *Am. J. Clin. Pathol.* **68**: 39-44.
- MADEIRA-LOPES, A. 1986. Thermal death potentiation by amphotericin B in *Cryptococcus neoformans* and its dependence on pre-incubation temperature. *Sabouraudia* **24**: 35-40.
- MADEIRA-LOPES, A., VAN UDEN, N. 1982. The temperature profile of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* **20**: 331-334.
- MALIK, R., DILL-MACKY, E.D., MARTIN, P., WIGNEY, D.I., MUIR, D.B., LOVE, D.N. 1995. Cryptococcosis in dogs: a retrospective study of 20 consecutive cases. *J. Med. Vet. Micol.* **33**: 291-297.
- MANDEL, M., MARMUR, J. 1968. Use of a ultraviolet absorbance-Temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Meth. Enzymol.* **12**: 195-206.
- MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., WAGNER, M., SCHLEIFER, K. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
- MARMUR, J., DOTY, P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **5**:109-118.

- MARTINI, A., MARTINI, A.V. 1992. Assignment of *Kluyveromyces cellobiovorus* nomen nudum to *Candida intermedia* (Ciferri & Ashford) Langeron et Guerra. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**:57-60.
- MARTINS, H.M., BERNARDO, F.M., MARTINS, M.L. 1996. *Cryptococcus* spp. associated with eucalyptus trees in Lisbon, Portugal. 3rd. Meeting of E.C.M.M., P 7.1.
- MCGINNIS, M.R., RINALDI, M.G., HALDE, C., HILGER, A.E. 1975. Mycotic flora of the interdigital spaces of the human foot: a preliminary investigation. *Mycopathologia* **55**: 47-52.
- MCMANUS, E.J., JONES, J.M. 1985. Detection of a *Trichosporon beigeli* antigen cross-reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in serum from a patient with disseminated *Trichosporon* infection. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 681-685.
- MELCHER, G.P., REED, K.D., RINALDI, M.G., LEE, J.W., PIZZO, P.A., WALSH, T.J. 1991. Demonstration of a cell wall antigen cross-reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental disseminated trichosporonosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 192-196.
- MEYER, W., MITCHELL, T.G. 1995. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *C. neoformans*. *Electrophoresis* **16**: 1648-1656.
- MEYER, W., LATOUCHE, G.N., DANIEL, H.M., THANOS, M., MITCHELL, T., YARROW, D., SCHNIAN, G., SORRELL, T. 1997. Identification of pathogenic yeasts of the imperfect genus *Candida* by polymerase chain reaction fingerprinting. *Electrophoresis* **18**: 1548-1559.
- MEYER, W., MARSZEWSKA, K., AMIRMOSTOFIAN, M., IGREJA, R., HARDTKE, C., METHLING, K., VIVIANI, M.A., CHINDAMPORN, A., SUKROONGREUNG, S., JOHN, M.A., ELLIS, D., SORRELL, T. 1999. Molecular typing of global isolates of *C. neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* **20**: 1790-1799.
- MEYER, W., MITCHELL, T.G., FREEDMAN, E.Z., VILGALYS, R. 1993. Hybridisation probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2274-2280.
- MILLER, M.F., MITCHELL, T.G., STORKUS, W.J., DAWSON, J.R. 1990. Human natural killer cells do not inhibit growth of *Cryptococcus neoformans* in the absence of antibody. *Infect. Immun.* **58**: 639-645.
- MIN, K.H., KWON-CHUNG, K.J. 1986. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CCB medium. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A* **261**: 471-480.
- MISHRA, S.K., STAIB, E., FOLKENS, U., FROMTLING, R.A. 1981. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **14**: 106-107.
- MITCHELL, T.G., FREEDMAN, E.Z., WHITE, T.J., TAYLOR, J.W. 1994. Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 253-255.
- MITCHELL, T.G., PERFECT, J.R. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS -100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 515-548
- MITCHELL, T.G., SANDIN, R.L., BOWMAN, B.H., MEYER, W., MERZ, W.G. 1994. Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. *J. Med. Vet. Micol.* **32**: 351-336.
- MOHR, J.A., LONG, H., MCKOWN, B.A., MUCHMORE, H.G. 1972. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to steroids. *Sabouraudia* **10**: 171-172.
- MOORE, T.D., EDMAN, J.C. 1993. The α -mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1962-1970.
- MOSBERG, W.H., ALVAREZ-DECCOUDENS, J.A. 1951. Torulosis of the central nervous system. Effect of changes in pH and temperature on growth of the casual organism. *Lancet* **1**: 1259-1260.

- MOSER, S.A., FRIEDMAN, L., VARRAUX, A.R. 1978. Atypical isolate of *C. neoformans* cultured from sputum of a patient with pulmonary cancer and blastomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **7**: 316-318.
- MOTER, A., GÖBEL, U.B. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* **41**: 85-112.
- MOTER, A., LEIST, G., RUDOLPH, R., SCHRANK, K., CHOI, B., WAGNER, M., GÖBEL, U.B. 1998. Fluorescence *in situ* hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology* **144**: 2459–2467.
- MUCHMORE, H.G., SCOTT, E.N., FELTON, EG., FROMTLING, R.A. 1980. *Cryptococcus neoformans* serotype groups encountered in Oklahoma. *Am. J. Epidemiol.* **112**: 32-38.
- MUHSIN, T.M., AUBAID, A.H., AL-DUBOON, A.H. 1997. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses* **40**: 465-469.
- MUKAMURANGWA, P., RAES-WUYTACK, C., DE VROEY, C. 1995. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can be separated from var. *neoformans* by its ability to assimilate D-tryptophan. *J. Med. Vet. Micol.* **33**: 419-420.
- MUKHERJEE, J., CLEARE W., CASADEVALL A. 1995. Monoclonal antibody mediated capsular reactions (quellung) in *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol. Methods* **184**: 139-143.
- MÜLLER, H.E., SETHI, K.K. 1972. Proteolytic activity of *C. neoformans* against human plasma proteins. *Med. Microbiol. Immunol.* **158**: 129-134.
- MÜLLER, J. 1990. Immunological aspects of cryptococcosis in AIDS patients. In *Mycoses in AIDS patients*. H. Vanden Bossche, D. Mackenzie, G. Cauwenbergh, J. Van Cutsem, E. Drouhet, B. Dupont (Eds.) pp.123-132, Plenum Press, New York.
- MURAKAWA, G., KERSCHMANN, R., BERGER, T. 1996. Cutaneous *Cryptococcus* infection and AIDS. Report of 12 cases and review of the literature. *Arch. Dermatol.* **132**: 545-548.
- NAKAMURA, Y., KANO, R., SATO, H., WATANABE, S., TAKAHASHI, H., HASEGAWA, A. 1998. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromotimol blue medium. *Mycoses* **41**: 35-40.
- NAKASE, T., KOMAGATA, K. 1971. Significance of DNA base composition in the classification of the yeast genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **17**: 121-130.
- NEELLY, A.N., HOLDER, I.A. 1990. Effect of proteolytic activity on virulence of *Candida albicans* in burned mice. *Infect. Immun* **58**: 1527-1531.
- NEGRONI, P., NEGRONI, C.B. 1951. Estudios sobre el *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) II. Aspecto micromorfológico y citología. *An. Soc. Cient. Argentina.* **151**: 71-76
- NEILSON, J.B., FROMTLING, R.A., BULMER, G.S. 1977. *C. neoformans*: size range of infectious particles from aerosolized soil. *Infect. Immun.* **17**: 634-638.
- NEILSON, J.B., FROMTLING, R.A., BULMER, G.S. 1981. Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: decreased survival in vivo. *Mycopathologia* **73**: 57-59.
- NEILSON, J.B., IVEY, M.H., BULMER, G.S. 1978. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect. Immun.* **20**: 262-266.
- NEURATH, H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes. In *Proteolytic Enzymes, a Practical Approach*. R. J. Beynon and J.S. Bond (Eds.), pp. 1-13, IRL Press, Oxford.
- NISHIKAWA, M.M., SANT'ANNA, O.D., LAZERA, M.S., WANKE, B. 1996. Use of D-proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *J. Med. Vet. Mycol.* **34**: 365-366.

- NISHIURA, Y., NAKAGAWA-YOSHIDA, K., SUGA, M., SHINODA, T., GUEHO, E., ANDO, M. 1997. Assignment and serotyping of *Trichosporon* species: the causative agents of summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**: 45-52.
- NOSANCHUK, J.D., CASADEVALL, A. 1997. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin and monoclonal antibody binding. *Infect. Immun.* **65**: 1836-1841.
- NOSANCHUK, J.D., ROSAS, A.L., LEE, S.C., CASADEVALL, A. 2000. Melanization of *C. neoformans* in brain tissue. *Lancet* **355**: 2049-2050.
- NOSANCHUK, J.D., RUDOLPH, J., ROSAS, A.L., CASADEVALL, A. 1999. Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. *Infect Immun.* **67**: 5477-5479.
- NURUDEEN, T.A., AHEARN, D.G. 1979. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **10**: 724-729.
- NYHUS, K.J., WILBOM, A.T., JACOBSON, E.S. 1997. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **65**: 434-438.
- ODDS, F.C., BACKER, T., DAMS, G., VRANCKX, L., WOESTENBORGH, F. 1995. Oxygen as a limiting nutrient for growth of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 995-997.
- ODOM, A., MUIR, S., LIM, E., TOFFALETTI, D., PERFECT, J., HEITMAN, J. 1997. Calcineurin is required for virulence of *C. neoformans*. *EMBO J.* **16**: 2576-2589.
- OLIVEIRA, M., COSTA V., SANCHES, M., MASSA, A. 1992. Criptococose cutânea em doente com SIDA. *Trab. Soc. Port. Derm. Ven.* **52**: 45-48.
- PADHYE, A.A., CHAKRABARTI, A., CHANDER, J., KAUFMAN, L. 1993. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in India. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**: 165-168.
- PAL, M. 1991. Feline meningitis due to *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and review of feline cryptococcosis. *Mycoses.* **34**: 313-316.
- PAL, M. 1993. Pulmonary mycosis in a pigeon handler due to *C. neoformans* var. *neoformans*. 2nd International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. Milano, Italy, P4-5
- PALIWAL, D.K., RANDHAWA, H.S. 1978. A rapid pigmentation test for identification of *Cryptococcus neoformans*. *Antonie van Leeuwenhoek* **44**: 243-246.
- PARTRIDGE, B.M., WINNER H.I. 1965. *Cryptococcus neoformans* in bird droppings in London. *Lancet* **i**: 1060-1061.
- PERFECT, J.R., MAGEE, B.B., MAGEE, P.T. 1989. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulse field gel electrophoresis. *Infect. Immun.* **57**: 2624-2627.
- PERFECT, J.R., TOLRALETTI, D.L., RUDE, T.H. 1993. The gene encoding phospho-ribosylaminoimidazole carboxylase (*ADE2*) is essential for growth of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *Infect. Immun.* **6**: 4446-4451.
- PERNICE, I., PASSO, C.L., PERNICE, A., TODARO-LUCK, F. 1998. Molecular subtyping of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A isolated from southern Italy. *Mycoses* **41**: 117-124.
- PETERSON, S.W., KURTZMAN, C.P. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *System. Appl. Microbiol.* **14**: 124-129.
- PFEIFFER, T.J., ELLIS, D.H. 1991. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans gattii* from California. *J. Infect. Dis.* **163**: 929-930.
- PFEIFFER, T.J., ELLIS, D.H. 1992. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 407-408.

- PFEIFFER, T.J., ELLIS, D.H. 1993. Serotypes of Australian environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**: 401-404.
- PHAN, Q.T., BELANGER, P.H., FILLER, S.G. 2000. Role of Hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect. Immun.* **68**: 3485-3490.
- PIDCOE, V., KAUFMAN, L. 1968. Fluorescent-antibody reagent for the identification of *Cryptococcus neoformans*. *Appl. Microbiol.* **16**: 271-275.
- PINNER, R.W., HAJJEH, R.A. 1995. Prospects for preventing cryptococcosis in persons infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clin Infect. Dis.* **21**: S103-S107.
- PIROFSKI, L., LUI R., DESHAW M., KRESSEL A.B., ZHONG Z. 1995. Analysis of human monoclonal antibodies elicited by vaccination with a *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan capsular polysaccharide vaccine. *Infect. Immun.* **63**: 3005-3014.
- POLACHECK, I., KWON-CHUNG, K.J. 1980. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *bacillisporus*. *J. Bacteriol.* **142**: 15-20.
- POLACHECK, I., KWON-CHUNG, K.J. 1986. Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**: 468-473.
- POLACHECK, I., KWON-CHUNG, K.J. 1988. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1037-1041.
- POLACHECK, I., LEBENS, G.A. 1989. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 65-71.
- POLACHECK, I., HEARING, V.J., KWON-CHUNG, K.J. 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **150**: 1212-1220.
- POLACHECK, I., LEBENS, G., HICKS, J.B. 1992. Development of DNA probes for early diagnosis and epidemiological study of Cryptococcosis in AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 925-930.
- POLAK, A. 1989. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses* **33**: 215-224.
- POSTERARO, B., SANGUINETTI, M., MASUCCI, L., ROMANO, L., MORACE, G., FADDA, G. 2000. Reverse cross blot hybridization assay for rapid detection of PCR-amplified DNA from *Candida* species, *C. neoformans* and *Saccharomyces cerevisiae* in clinical samples. *J. Clin Microbiol.* **38**: 1609-1614.
- POUNDEN, W.D., AMBERSON J.M., JAEGER R.E. 1952. A severe mastitis problem associated with *Cryptococcus neoformans* in a large dairy herd. *Am. J. Vet. Res.* **13**: 121-128.
- POWDERLY, W.G., CLOUD, G.A., DISMUKES, WES, M.S. 1994. Measurement of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid: value in the management of AIDS-associated cryptococcal meningites. *Clin. Infect. Dis.* **18**: 789-792.
- RANDHAWA, H.S., PAL, M. 1977. Occurrence and significance of *Cryptococcus neoformans* in the respiratory tract of patients with bronchopulmonary disorders. *J. Clin. Microbiol.* **5**: 5-8.
- RANDHAWA, H.S., PALIWAL, D.K. 1977. Occurrence and significance of *Cryptococcus neoformans* in the oropharynx and on the skin of a healthy human population. *J. Clin. Microbiol.* **6**: 325-327.
- RAPPELLI, P., ARE, R., CASU, G., FIORI, P.L., CAPPUCCINELLI, P., ACETI, A. 1998. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3438-3440.
- RAY, M.K., DEVI, K.U., KUMAR, G.S., SHIVAJI, S. 1992. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1918-1923.
- REBERS, P.A., BARKER, S.A., HEIDELBERGER, M., DISCHE, Z., EVANS, E.E. 1958. Precipitation of the specific polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* A by types II and XIV antipneumococcal sera. *J. Am. Chem Soc.* **80**: 1135-1137.

- REEVES, D.L., HAMMACK, R. 1941. Torula infection of the lungs and central nervous system. *Arch. Inter. Med.* **68**: 57-79.
- REFAL, M., TAHA, M., SELIM, A., ELSHABOURII, E., YOUSSEFF, H.H. 1983. Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other yeasts from pigeon droppings in Egypt. *Sabouraudia* **21**: 163-165.
- REISS, E., SZILAGYI, G. 1965. Ecology of yeast-like fungi in a hospital population. Detailed investigation of *Cryptococcus neoformans*. *Arch. Dermatol.* **91**: 611-614.
- RESTREPO, B.I., BARBOUR, A. 1989. Cloning of 18S and 25S rDNAs from the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **171**: 5596-5600.
- RHODES, J.C., POLACHECK, I., KWON-CHUNG, K.J. 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **36**: 1175-1184.
- RICE, J., O'CONNOR, C.D., SLEIGH, M.A., BURKILL, P.H., GILES, I.G., ZUBKOV, M.V. 1997a. Fluorescent oligonucleotide rDNA probes that specifically bind to a common nanoflagellate, *Paraphysomonas vestita*. *Microbiology* **143**: 1717-1727.
- RICE, J., SLEIGH, M., A., BURKILL, P.H., TARRAN, G.A., O'CONNOR, C.D., ZUBKOV, M.V. 1997b. Flow cytometric analysis of characteristics of hybridization of species-specific fluorescent oligonucleotide probes to rRNA of marine nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 938-944.
- RINALDI, M., DRUTZ, D., HOWELL, A., SANDE, M., WOFSEY, C., HADLEY, W. 1986. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **153**: 642.
- ROBERT, H., ELIAHOU, B., SHARON, M. 1986. Cryptococcal Infections in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Amer. J. Med.* **81**: 19-23.
- RODRIGUES DE SOUSA, H., MADEIRA-LOPES, A., SPENCER-MARTINS, I. 1995. The significance of active fructose transport and maximum temperature for growth in the taxonomy of *Saccharomyces sensu stricto*. *System. Appl. Microbiol.* **18**: 44-51.
- ROLLER, C., WAGNER, M., AMMAN, R., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. 1994. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**: 2849-2858.
- ROSAS, A.L., CASADEVALL, A. 1997. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 265-272.
- ROZENBAUM, R., GONÇALVES, A. 1991. Criptococose pulmonar. *Arq. Bras. Med.* **65**: 33-37.
- ROZENBAUM, R., GONÇALVES, A.J., WANKE, B., CAIUBY, M.J., CLEMENTE, H., LAZERA, M.D.S., MONTEIRO, P.C.E., LONDERO, A.T. 1992. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathologia* **119**: 133-136.
- ROZENBAUM, R., GONÇALVES, A.J., WANKE, B., VIERA, W. 1990. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Brazilian AIDS patient. *Mycopathologia* **112**: 33-34.
- RUANE, P., WALHER, L., GEORGE, W. 1988. Disseminated infection caused by urease-negative *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2224-2225.
- RÜCHEL, R., DE BERNARDIS, F., RAY, T.Y., SULLIVAN, P.A., COLE, G.T. 1992. *Candida* acid proteinases. *J. Med. Vet. Mycol.* **30** (Suppl.1):123-132.
- RUIZ, A., NEILSON, J.B., BULMER, G.S. 1982a. A one year study on the viability of *Cryptococcus neoformans* in nature. *Mycopathologia* **77**: 117-122.
- RUIZ, A., NEILSON, J.B., BULMER, G.S. 1982b. Control of *Cryptococcus neoformans* in nature by biotic factors. *Sabouraudia* **20**: 21-29.

- RUIZ, A., VELEZ, D., FROMTLING, R. A. 1989. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. *Mycopathologia* **106**: 167-170.
- RUSTCHENKO, E.P., CURRAN, T.M., SHERMAN, F. 1993. Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**: 7189-7199.
- SAGONE, M., DROMER, F., PINI, G., RONIN, O. 1993. Cryptococcosis in Italy: serotypes of clinical isolates from patients with or without HIV infection. 2nd International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. Milano, Italy, P2-5.
- SAITOU, N., NEI, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- SAKAGUCHI, N., BABA, T., FUKUZAWA, M., OHNO, S. 1993. Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. *Mycopathologia* **121**: 133-141.
- SALKIN, F.I., HURD, N.J. 1982. New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs. *J. Clin. Microbiol.* **15**:169-171.
- SALKOWSKI, C.A., BALISH, E. 1991. Cutaneous cryptococcosis in athimic and beije-athimic mice. *Infect. Immun.* **59**: 1785-1789.
- SAMBROOK, J., FRITCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- SANFELICE, F. 1894. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann. Ig.* **4**: 463-495.
- SANGER, F., COULSON, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**: 441-448.
- SANSINFORIANO, M.E., PADILLA, J.A., MENDOZA, J.H., MENDOZA, M.H., FERNANDEZ-GARCIA, J.L., MARTINEZ-TRANCON, M., RABASCO, A., PAREJO, J.C. 1998. Rapid and easy method to extract and preserve DNA from *Cryptococcus neoformans* and other pathogenic yeasts. *Mycoses* **41**: 195-198.
- SATO, T., KOSEKI, S., TAKAHASHI, S., MAIE, O. 1990. Localised cutaneous cryptococcosis successfully treated with itraconazole. Review of medication in 18 cases reported in Japan. *Mycoses* **33**: 455-463.
- SCHEPELMANN, K., MULLER, F., DICHGANS, J. 1993. Cryptococcal meningitis with severe visual and hearing loss radiculopathy in a patient without immunodeficiency. *Mycoses* **36**: 492-432.
- SCHMEDING, K., JONG, S., HUGH, R. 1981. Sexual compatibility between serotypes of *F. neoformans*. *Curr. Micobiol.* **5**: 133-138.
- SCHNEE-GREESE, J., LINDER, S. 1989. DNA extraction for PCR: phenol/chloroform vs. Chelex - a comparative study. *Adv. Forens. Haemogenetics* **6**: 167-169.
- SCHÖNHUBER, W., FUCHS, B., JURETSCHKO, S., AMANN, R. 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3268-3273.
- SCHÖNHUBER, W., ZARDA, B., EIX, S., RIPPKA, R., HERDMAN, M., LUDWIG, W., AMANN, R. 1999. In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1259-1267.
- SEELIGER, H.P.R. 1956. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *J. Bacteriol.* **72**: 127-131.
- SEIDLER, R., MANDEL, M. 1971. Quantitative aspects of deoxyribonucleic acid renaturation: base composition, state of chromosome replication and polynucleotide homologies. *J. Bacteriol.* **106**: 608-614.

- SEKHON, A.S., BANNERJEE, S.N., MIELKE, B.M., IKIDIO, H., WOOD, G., DIXON, J.M. 1990. Current status of cryptococcosis in Canada. *Mycoses* **32**: 73-80.
- SHADOMY, H.J., LURIE, H.I. 1971. Histopathological observations in experimental cryptococcosis caused by a hypha-producing strain of *Cryptococcus neoformans* (coward strain) in mice. *Sabouraudia* **9**: 6-9.
- SHADOMY, H.J., UTZ, J.P. 1966. Preliminary studies on a hypha-forming mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **58**: 383-390.
- SHADOMY, H.J., WOOD-HELIE, S., SHADOMY, S., DISMUKES, W.E., CHAU, R.Y., and the NIAID Mycoses Study Group. 1987. Biochemical serogrouping of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **6**: 131-138.
- SHAW, C.E., KAPICA, L. 1972. Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Appl. Microbiol.* **24**: 824-830.
- SHIMIZU, R.Y., HOWARD, D.H., CLANCY, M.N. 1986. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* **154**: 1042.
- SILVA, M., PAULA, L. 1963. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos (*Columba livia*) em Salvador, Bahia (Brasil). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **5**: 9-11.
- SINGER-SAM, J., TANGGUAY, R., RIGGS, A., 1989. Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* **3**:11.
- SMALL, J.M., MITCHEL, T.G. 1989. Strain variation in antiphagocytic activity of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Infect. Immun.* **57**: 3751-3756.
- SMIT, E., KOCK, J., WESTHUIZEN, J., LATEGAN, P.M. 1987. The long-chain fatty acid composition of the two varieties of *Filobasidiella neoformans*. *System. Appl. Microbiol* **10**: 28-30.
- SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- SOLER, R.B., BRIONES, V., RODELLAS, A. 1995. Cryptococcosis cutânea. *Piel* **10**: 303-307.
- SORRELL, T.C., BROWNLEE, A.G., RUMA, P., MALIK, R., PFEIFFER, T.J., ELLIS D.H. 1996a. Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1261-1263
- SORRELL, T.C., CHEN, S.C.A., RUMA, P., MEYER, W., PFEIFFER, T.J., ELLIS D.H., BROWNLEE, A.G. 1996b. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1253-1260.
- SOTGIU, G., MAZZONI, A., MANTOVANI, A., AJELLO, L., PALMER, J. 1966. Survey of soils for human pathogenic fungi from the Emilia-Romagna region of Italy II. Isolation of *Allescheria Boydii*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. *Am. Epidemiol.* **83**: 329-337.
- SPEAR, R.N., LI, S., NORDHEIM, E.V., ANDREWS, J.H. 1999. Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*. *J. Microbiol. Methods* **35**: 101-110.
- SPEED, B., DUNT, D. 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis.* **21**: 28-34.
- SPEED, B.R., STRAWBRIDGE, L., ELLIS, D.H. 1993. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an Australian patient with AIDS. *J. Med. Vet. Micol.* **31**: 395-399.
- SPIROPULU, C., EPPARD R.A., OTTESON E., KOZEL T.R. 1989. Antigenic variation within serotypes of *Cryptococcus neoformans* detected by monoclonal antibodies specific for the capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* **57**: 3240-3242.
- SPITZER, E.D., SPITZER, S.G. 1992. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1094-1097.
- SPITZER, E.D., SPITZER, S.G., FREUNDLICH, L.F., CASADEVALL, A. 1993. Persistence of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* meningitis. *Lancet* **341**: 595-596.

- SPREADBURY, C.L., BAINBRIDGE, B.W., COHEN, J. 1990. Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1991-1994.
- SRUR, E., MISAD, C., HENRIQUEZ, A. 1995. Extrameningeal cryptococcosis in a patient with AIDS. *Ver. Med. Child.* **123**: 1009-1012.
- ST.-GERMAIN, G., NOEL, G., KWON-CHUNG, K. 1988. Disseminated cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* in a Canadian patient with AIDS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**: 587-588.
- STAIB, E. 1962. Vogelkot, ein Nahsubstrat für die Gattung *Cryptococcus*. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt. I. Orig.* **A 186**: 233-247.
- STAIB, E., RANDHAWA, H.S., SENSKA, M., BLISSE, A., WULKOW, R. 1973. Peach and peach juice as a nutrient for *Cryptococcus neoformans* with comments on some observations of E. Sanfelice. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt. 1 Orig.* **A 224**: 120-127.
- STAIB, E., SEIBOLD, M., ANTWEILER, E., FROHLICH, B., WEBER, S., BLISSE, A. 1987. The brown color effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg.* **A 266**: 167-177.
- STAIB, F. 1965. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* **4**: 187-193.
- STEENBERGEN, J.N., CASADEVALL, A. 2000. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) isolates in New York City. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1974-1976.
- STILL, C., JACOBSON, E. 1983. Recombinational mapping of capsule mutations in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **156**: 460-462.
- STOCKMAN, L., ROBERTS, G. 1983. Specificity of the latex test for cryptococcal antigen: a rapid, simple method for eliminating interference factors. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 945-947.
- STORCK, R., ALEXOPOULOS, C.J., PHAFF, H.J. 1969. Nucleotide composition of deoxyribonucleic acid of some species of *Cryptococcus*, *Rhodotorula* and *Sporobolomyces*. *J. Bacteriol.* **98**: 1069-1072.
- STRACHAN, A.A., YU, R.J., BLANK, F. 1971. Pigment production of *Cryptococcus neoformans* grown with extracts of *Guizotia abyssinica*. *Appl. Microbiol.* **22**: 478-479.
- SULLIVAN, D., BENNETT, D., HENMAN, M., HARWOOD, P., FLINT, S., MULCAHY, F., SHANLEY, D., COLEMAN, D. 1993. Oligonucleotide fingerprinting of isolate of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS Patients. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2124-2133.
- SULLIVAN, D., HAYNES, K., MORAN, G., SHANLEY, D., COLEMAN, D. 1996. Persistence, replacement and microevolution of *Cryptococcus neoformans* strains in recurrent meningitis in AIDS Patients. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1739-1744.
- SWINNE, D. 1979a. *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **59**: 285-299.
- SWINNE, D. 1979b. *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin 1894 and the epidemiology of cryptococcosis. *Acta Zool. Pathol. Antwerp.* **74**: 5-134.
- SWINNE, D. 1984. Study of *Cryptococcus neoformans* varieties. *Mykosen.* **27**: 137-41.
- SWINNE, D., BOGAERTS, J., VAN DE PERRE, P., BATUNGWANAYO, J., TAELEMAN, H. 1992. Evaluation of the cryptococcal antigen test as a diagnostic tool of AIDS-associated cryptococcosis in Rwanda. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **72**: 283-288.

- SWINNE, D., KAYEMBE, K., NIYIMI, M. 1986a. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Kinshasa, Zaire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **66**: 57-61.
- SWINNE, D., NKURIKIYINFURA, J.B., MUJEMBE, T.L. 1986b. Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Zaire. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**: 50-51.
- SWINNE-DESGAIN, D. 1974. The pigeon as reservoir for *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* **ii**: 842-843.
- SWINNE-DESGAIN, D. 1975. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Sabouraudia* **3**: 303-308.
- TAKEO, K., UESAKA I., UEHIRA K., NISHIURA M. 1973. Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vivo as observed by freeze-etching. *J. Bacteriol.* **113**:1449-1454.
- TANAKA, K., MIYAZAKI, T., MAESAKI, S., MITSUTAKE, K., KAKEYA, H., YAMAMOTO, Y., YANAGIHARA, K., HOSSAIN, M.A., TASHIRO T., KOHNO, S. 1996. Detection of *Cryptococcus neoformans* gene in patients with pulmonary Cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2826-2828.
- TODARO-LUCK, E., REISS, E., CHEMIK, R., KAUFMAN, L. 1989. Characterization of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan polysaccharide with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **57**: 3882-3887.
- TORRES-GUERRERO, H., EDMAN, J.C. 1994. Melanin deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**: 303-313.
- TORTORANO, A.M., VIVIANI, M.A., RIGONI, A.L., COLIGATI, M., ROVERSELLI, A., PAGANO, A. 1997. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy. *Mycoses* **40**: 297-302.
- TSUBOI, R., SANADA, T., TAKAMORI, K., OGAWA, H. 1987. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. *J. Bacteriol.* **169**: 4104-4109.
- VAN DE PEER, Y., ROBBRECHT, E., DE HOOG, S., CAERS, A., DE RIJK, P., DE WACHTER, P. 1999. Database on the structure of small subunit ribosomal RNA. *Nucl. Acid Res.* **27**: 179-183.
- VAN UDEN, N. 1984. Temperature profiles of yeasts. *Adv. Microbiol. Physiol.* **25**: 195-251.
- VAN UDEN, N., SOUSA, L.D.C., FARINHA, M. 1958. On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats, and swine. *J. Gen. Microbiol.* **19**: 435-445.
- VANBREUSEGHEM, R., TAKASHIO, M. 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin. Part II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **50**: 695-702.
- VANCANNEYT, M., LERBERGE, E.V., BERNY, J.F., HENNEBERT, G.L., KERSTERS, K. 1992. The application of whole-cell protein electrophoresis for the classification and identification of basidiomycetous yeast species. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**: 69-78.
- VANDEPITTE, J. 1990. Clinical aspects of cryptococcosis in patients with AIDS. In *Mycoses in AIDS patients*. H. Vanden Bossche, D. Mackenzie, G. Cauwenbergh, J. Van Cutsem, E. Drouhet, B. Dupont, (Eds.). pp.115-122, Plenum Press, New York.
- VANEECHOUTTE, M., ROSSAU, R., DE VOS, P., GILLIS, M., JANSSENS, D., PAEPE, N., DE ROUCK, A., FIERIS, T., CLAEYS, G., KERSTERS, K. 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 227-234.
- VARMA, A., KWON-GHUNG, K.J. 1989. Restriction fragment polymorphism in mitochondrial DNA of *Cryptococcus neoformans*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3353-3362.
- VARMA, A., KWON -GHUNG, K.J. 1991. Rapid method to extract DNA from *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 810-812.
- VARMA, A., KWON -GHUNG, K.J. 1992. DNA probe for strain typing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2960-2967.

- VARMA, A., SWINNE, D., STAIB, F., BENNETT, J.E., KWON-CHUNG, K.J. 1995. Diversity of DNA fingerprints in *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1807-1814.
- VARTIVARIAN, S.E., ANAISSIE, E.J., COWART, R.E., SPRIGG, H.A., TINGLER, M.J., JACOBSON, E.S. 1993. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J. Infect. Dis.* **167**: 186-190.
- VARTIVARIAN, S.E., COWART, R.E., ANAISSIE, E.J., TASHIRO, T., SPRIGG, H.A. 1995. Iron acquisition by *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**: 151-156.
- VARTIVARIAN, S.E., REYES, G.H., JACOBSON, E.S., JAMES, P.G., CHERNIAK, R., MUMAW, V.R., TINGLER, M.J. 1989. Localization of mannoprotein in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **171**: 6850-6852.
- VASQUEZ-JUAREZ, R., ASCENCIO, F., ANDLID, T., GUSTAFSSON, L., WADSTROM, T. 1993. The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. *Can. J. Microbiol.* **39**: 1135-1141.
- VIDOTTO, V., AOKI, S., CAMPANINI, G. 1996. A vitamin-free minimal synthetic medium for *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **133**: 139-142.
- VILGALYS, R.J., HESTER, N.I. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* **172**: 4238-4246.
- VOGEL, R. A. 1966. The indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody in human cryptococcal disease. *J. Infect. Dis.* **116**: 573-580.
- VUILLEMIN, P. 1901. Les blastomycètes pathogènes. *Rev. Gen. Sci. Pures Appl.* **12**: 732-751.
- WAHYUNINGSIH, R., FREISLEBEN, H., SONNTAG, H., SCHNITZLER, P. 2000. Simple and rapid detection of *C. albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3016-3021.
- WALSH, P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**: 506-513.
- WALTER, J.E., COFFEE, E.G. 1968. Primary isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon excreta on tree media. *Sabouraudia* **6**: 165-167.
- WANG, Y., AINSEN, P., CASADEVALL, A. 1995. *Cryptococcus neoformans* melanin and fungal virulence: mechanisms of action. *Infect. Immun.* **63**: 3131-3136.
- WANG, Y., AINSEN, P., CASADEVALL, A. 1996. Melanin, melanin "ghosts" and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **64**: 2420-2424.
- WANG, Y., CASADEVALL, A. 1994a. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3864-3866.
- WANG, Y., CASADEVALL, A. 1994b. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 2648-2650.
- WANG, Y., CASADEVALL, A. 1994c. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect. Immun.* **62**: 3004-3007.
- WEIDMAN, E.D., FREEMAN, W. 1924. India ink in the microscopic study of yeast cells. *JAMA* **83**: 1163-1164.
- WHITE, C.W., JACOBSON, E.S. 1985. Occurrence of diploid strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* **161**: 1231-1232.
- WHITTIER, S., HOPFER, R.L., GILLIGAN, P.H. 1994. Elimination of false-positive serum reactivity in latex agglutination test for cryptococcal antigen in human immunodeficiency virus-infected population. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2158-2161.
- WICKES, B., MAYORGA, M.E., EDMAN, U., EDMAN, J.C. 1996. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* association with the α -mating type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7327-7331.

- WICKES, B., MOORE, T.D.E., KWON-CHUNG, K.J. 1994. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **140**: 543-550.
- WILLIAMSON, J.D., SILVERMAN, J.F., MALLAK, L.C.T., CHRISTIE, J.D. 1996. Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans* a report of five cases. *Acta. Cytol.* **40**: 363-370 .
- WILLIAMSON, P. 1994. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J. Bacteriol.* **176**: 656-664.
- WILSON, D.E., BENNETT, J.E., BAILEY, J.W. 1968. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* **127**: 820-830.
- WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- YAMAMOTO, Y., KOHNO, S., KOGA, H., KAKEYA, H., TOMONO, K., KAKU, M., YAMAZAKI, T., ARISAWA, M., HARA, K. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3328-3332.
- YARROW, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance of yeasts. *In* The Yeasts, a Taxonomic Study, C.P. Kurtzman and J.W. Fell (Eds.) , 4th Ed., pp. 656-662, Elsevier, Amsterdam.
- ZIMMER, B.L., ROBERTS, C.D. 1979. Rapid selective urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans* *J. Clin. Microbiol.* **10**: 380-381.

APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA

Meio de Sabouraud		
glucose		4 % (p/v)
peptona	1 %	
agar	2 %	
Autoclavar 15 min, 121°C.		

Meio de Sabouraud Modificado **(para reduzir a produção de polissacáridos capsulares)**

peptona	1 % (p/v)
glucose	16 %
NaCl	2,9 %

Ajustar a pH 4,2.
Autoclavar 15 min, 121°C.

Meio YM	
extracto de levedura	0,3 % (p/v)
extracto de malte	0,3 %
peptona	0,5 %
glucose	1 %
agar	2 %
Autoclavar 15 min, 121°C.	

Meio MYP	
extracto de levedura	0,05 % (p/v)
extracto de malte	0,7 %
soytone (DIFCO)	0,25 %
agar	1,5 %
Autoclavar 15 min, 121°C.	

Meio Mínimo (solução 10x concentrada)	
YCB (<i>Yeast Carbon Base</i> , DIFCO)	6,7 g
glucose	5 g
água desmineralizada	q.b. para 100 ml
Esterilizar por filtração.	

Corn-Meal Agar

<i>Corn Meal infusion</i> (DIFCO)	5 % (p/v)
agar	1,5 %
Autoclavar 15 min, 121°C.	

Meio de Sementes de Niger (produção de pigmento)

extracto de sementes de Niger <i>(Guizotia abyssinica)</i>	200 ml
glucose	1 g
agar	20 g
água desmineralizada	q.b. para 1 litro
Autoclavar 15 min, 121°C.	

Meio de D,L-DOPA (produção de pigmento)

glucose	0,005 % (p/v)
<i>Pancreatic Digest Casein</i> (BHL)	0,3 %
D,L - DOPA	0,02 %
YNB (sem aminoácidos)	0,17 %
agar	1,5 %

Ajustar a pH 5,5.

Solução A: D,L – DOPA

Dissolver 0,02 g de DOPA em 40 ml de água.
Esterilizar por filtração.

Solução B: Agar

Preparar uma suspensão de 1,5 g de agar em 40 ml de água.
Autoclavar 15 min, 121°C

Solução C: Meio de YNB (10x concentrado)

YNB sem a.a. - 0,17 g para 10 ml de água.
Esterilizar por filtração.

Solução D: Glucose e PDC

Preparar a solução 10 x concentrada:

glucose	3 % (p/v)
PDC	0,2 %

Esterilizar por filtração.

O meio completo (40 ml A + 40 ml B + 10 ml C + 10 ml D) deverá ser guardado a 4° C e usado no prazo de uma semana.

Meio de Christensen (produção de urease)

peptona	0,1 % (p/v)
NaCl	0,5 %
KH ₂ PO ₄	0,2 %
glucose	0,1 %
vermelho de fenol	0,0012 %

Ajustar a pH 6,8.

agar 2 %

Autoclavar 15 min, 121°C.

Esterilizar por filtração uma solução aquosa de ureia a 20% (p/v) que é adicionada (0,5 ml) ao meio autoclavado (4,5 ml). Distribuir por tubos esterilizados e inclinar.

Meio de Gelatina

gelatina (folhas de gelatina branca)	10 % (p/v)
YNB	0,67 %
glucose	0,5 %

Distribuir 4,5 ml por cada tubo de ensaio.

Autoclavar 15 min a 121°C.
 Deixar arrefecer um pouco.
 Adicionar 0,5 ml de uma solução de YNB + Glucose (10×).
 Deixar solidificar verticalmente.

Meio para Detecção de Proteases Aspárticas	
YCB (<i>Yeast Carbon Base</i>) (DIFCO)	1,17 % (p/v)
<i>Yeast Extract</i> (DIFCO)	0,01 %
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>) (DIFCO)	0,2 %
agar	2 %
Ajustar a pH 5,0.	

SOLUÇÕES

Soluções para PCR

Tampão de Lise (para extracção de DNA de *Cryptococcus neoformans* a partir da cultura)

Tris	50 mM
NaCl	250 mM
EDTA	50 mM
SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)	0,3 % (p/v)

Ajustar a pH 8.

Se a solução de lise estiver precipitada aquecer ligeiramente no micro-ondas.

Tampão de Ureia (para extracção de DNA de *Cryptococcus neoformans* em amostras clínicas)

ureia	8 M
NaCl	0,5 M
Tris	20 mM
EDTA	20 mM
SDS	2 % (p/v)

Acetato de Sódio (**NaAc**) **3 M**

Tampão TE

Tris	0,1 M
EDTA	0,1 M
Ajustar a pH 8.	

Tampão TAE 50x

Tris	242 g
ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M (pH 8)	100 ml
água bidestilada	q.b. para 1 litro

Tampão TBE 10x

Tris	108 g
ácido Bórico	55 g
EDTA 0,5M (pH 8)	40 ml
água bidestilada	q.b. para 1 litro

Brometo de Etídio (EtBr)

2 mg/ml

Solução de Aplicação das Amostras no Gel de Agarose

glicerol	30 % (p/v)
azul de bromofenol	0,25 %
EDTA	2 mM

Soluções para Análise Genômica Comparativa**Tampão de Lise (LB)** ([fosfato] = 0,24 M)

ureia	270 g (dissolver em 300 ml de ddH ₂ O, aquecer)
tampão Fosfato 4,8 M	28,1 ml
SDS 20% (p/v)	21,9 ml
água bidestilada	q.b. para 500 ml
Ajustar a pH 6,8.	

Tampão Fosfato 4,8 M

Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	213 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	168 g
água bidestilada	q.b. para 500 ml (aquecer)
Ajustar a pH 7,0.	

SDS 20%

SDS	20 g
água bidestilada	q.b. para 100 ml
Dissolver com agitação e um ligeiro aquecimento.	

Tampão de Lavagem (WB)

ureia	480 g (dissolver em 600 ml de ddH ₂ O aquecer)
tampão Fosfato 4,8 M	50 ml
água bidestilada	q.b. para 1000 ml
Ajustar a pH 6,8.	

EDTA Salino (Tampão SE)

EDTA	0,1 M
NaCl	0,15 M
água bidestilada	q.b. para 500 ml
Ajustar a pH 8,0 (com HCl).	
Manter a 4°C.	

Tampão Fosfato Diluído (LPB)

tampão Fosfato 4,8 M

1 ml

água bidestilada	q.b. para 480 ml
Ajustar a pH 6,8.	
Aquecer ligeiramente antes de usar.	

Tampão de Eluição (EB) ([fosfato] = 0,5 M)

fosfato 4,8 M	52 ml
água bidestilada	q.b. para 500 ml

Acetato de Sódio (NaAc)

3 M

SSC 20X

NaCl	3 M
citrato de sódio (Na ₂ Citr.2H ₂ O)	0,3 M

Ajustar a pH 7,0.
Manter refrigerada a 4°C.

Tampão de Reassociação

DMSO (Dimetilsulfóxido)	20% (v/v) em SSC 5x
-------------------------	---------------------

	Mistura Nitro-sulfúrica
ácido sulfúrico : ácido nítrico	20 :1

Mergulhar o material a lavar na mistura nitrossulfúrica durante 20 min.
Passar por água desmineralizada abundante e em seguida por etanol (95% v/v).
Escorrer bem. Secar na estufa a 80°C.

Soluções para Hibridação *In Situ*

1x PBS

Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM

Ajustar a pH 7,2.

Tampão de Hibridação (volume de 2 ml)

formamida	variável (para 20% v/v, 400 µl formamida)
NaCl 5 M	360 µl
Tris/HCl 1M, pH 8	40 µl
água destilada	variável (p/ 20 %, 1198 µl formamida)
SDS 10 % (p/v)	2 µl (adicionar em último)

Tampão de Lavagem (volume de 50 ml)

Tris/HCl 1M, pH 8	1 ml
NaCl	ver Tabela junta
EDTA 0,5 M, pH 8	ver Tabela junta
água destilada	q.b.
SDS 10 % (p/v)	50 µl (adicionar em último)

Tabela A1 - Equivalência entre a concentração de formamida utilizada no Tampão de Hibridação e as concentrações de cloreto de sódio e de EDTA no Tampão de Lavagem para que se mantenham as mesmas condições de restringência.

Concentração de formamida (% p/v) no Tampão de Hibridação	Concentração NaCl (M) no Tampão de Lavagem	Quantidade a adicionar ao Tampão de Lavagem (para vol. total de 50 ml)	
		NaCl (µl)	EDTA 0,5 M pH8 (µl)
0	0,900	9000	0
5	0,636	6300	0
10	0,450	4500	0
15	0,318	3180	0
20	0,225	2150	500
25	0,159	1490	500
30	0,112	1020	500
35	0,800	700	500
40	0,56	460	500
45	0,40	300	500
50	0,028	180	500
55	0,20	100	500
60	0,014	40	500
65	0,010	0	500
70	0,007	0	850
75	0,005	0	750
80	0,0035	0	675