

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Fernanda Harumi Maruyama

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES DE
Cryptococcus gattii NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL**

CUIABÁ - MT

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Fernanda Harumi Maruyama

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES DE
Cryptococcus gattii NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL**

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Dutra

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

CUIABÁ-MT

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

M389d Maruyama, Fernanda Harumi.
DIVERSIDADE GENÉTICA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES DE
Cryptococcus gattii NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL /
Fernanda Harumi Maruyama. -- 2019
50 f. ; 30 cm.

Orientadora: Valéria Dutra.

Co-orientador: Luciano Nakazato.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Cryptococcus gattii. 2. MLST. 3. genotipagem. 4.
criptococose. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615-8627 - Email : cpgvet@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Diversidade genética do complexo de espécies de *Cryptococcus gattii* no estado de Mato Grosso, Brasil"

AUTOR: Doutoranda Fernanda Harumi Maruyama

Tese de Doutorado defendida e aprovada em 21/02/2019.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientadora Doutora Valéria Dutra
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Valéria Dutra

Examinador Interno Doutor Kledir Anderson Hofstaetter Spahr
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Kledir Spahr

Examinador Interno Doutora Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida

Examinador Externo Doutora Isabela de Godoy Menezes
Instituição : PÓS-DOCTORANDA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS/USP

Isabela de Godoy Menezes

Examinador Externo Doutora Cristiane Silva Chitara
Instituição : FACULDADE LA SALLE DE LUCAS DO RIO VERDE/MT

Cristiane Silva Chitara

Examinador Suplente Doutor Richard de Campos Pacheco
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sonia Ayako e Mauro Sadaaki, dedico com imensa e eterna gratidão esta tese, a qual eu não conseguiria sem o total apoio de vocês!

Ao Álvaro Felipe e a Manju, pelo apoio, companheirismo, paciência e por todo amor!

A todos os meus familiares e amigos, que me acompanharam e me apoiaram nesse caminho de aprendizagem!

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Valéria Dutra e Luciano Nakazato, agradeço imensamente por participarem, mais uma vez, da minha formação pessoal e profissional. Obrigada pela confiança, paciência, ajuda e por todos os ensinamentos.

Agradeço a todos os colegas dos Laboratórios de Microbiologia e Biologia molecular, os quais foram fundamentais no meu aprendizado pessoal e profissional.

Agradeço a todos os funcionários do Hospital Veterinário (HOVET-UFMT), os quais foram fundamentais para o desenvolvimento das atividades realizada nesta instituição de ensino.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado e ao Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGVET).

RESUMO

DIVERSIDADE GENÉTICA DO COMPLEXO DE ESPÉCIES DE *Cryptococcus gattii* NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL

Associada a alta mortalidade, a criptococose é causada pelo fungo do gênero *Cryptococcus*. Devido à sua importância, este estudo objetivou analisar a diversidade genética dos isolados de *C. gattii* de animais, humanos e do ambiente no estado de Mato Grosso (MT), Brasil, durante o período de Novembro de 2010 - Dezembro de 2017. Todos os isolados do complexo de espécies de *C. gattii* foram submetidos à genotipagem molecular através do Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) e da Tipagem da Sequência Múlti-locus (MLST). A análise de PCR-RFLP revelou que 21 isolados (100%) apresentaram o genótipo VGII, o qual é considerado o mais comum e virulento mundialmente. A análise de MLST revelou a presença de 14 tipos da sequência (STs), dos quais cinco foram considerados genótipos novos. O complexo clonal (CC) CC182 (n = 5; 23,80%) e CC309 (n = 3; 14,28%) foram os mais frequentes. A distribuição do CC em relação à origem revelou que três CCs foram encontrados em animais com predomínio do CC182 (66,66%), nove CCs em humanos e dois CCs no ambiente. Observou-se uma extensa variabilidade genética entre os isolados do estado de Mato Grosso. Os STs pertencentes aos complexos clonais (CC) já descritos indicaram a expansão global e a adaptação de isolados em vários outros países. Portanto, a detecção de complexos clonais e STs já descritos em outras regiões e a ocorrência de novos STs no presente estudo auxiliam na compreensão atual da dispersão geográfica e na origem genética do complexo de espécies de *C. gattii*.

Palavras-chaves: *Cryptococcus gattii*, MLST, genotipagem, criptococose

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY OF THE *CRYPTOCOCCUS GATTII* SPECIES COMPLEX IN MATO GROSSO STATE, BRAZIL

Associated with high mortality, the cryptococcosis is caused by fungi of the genus *Cryptococcus*. Owing to its importance, this study aimed to analyze the genetic diversity of *C. gattii* isolates from animals, humans, and the environment in Mato Grosso State (MT), Brazil, during November 2010–December 2017. All isolates of the *C. gattii* species complex were subjected to molecular genotyping via Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP) and Multi-locus Sequence Typing (MLST). PCR–RFLP analysis revealed that 21 isolates presented the genotype VGII, which is considered the most common and virulent genotype globally among. MLST analysis revealed the presence of 14 sequence types (STs), of which 5 are considered new genotypes. Clonal Complex (CC) CC182 (n = 5; 23,80%) and CC309 (n = 3; 14,28%) were the most frequent. CC distribution in relation to origin revealed that three CCs were found in animals with a predominance of CC182 (66,66%), while nine in humans, and two CCs in the environment. Extensive genetic variability was observed among the isolates in the State of Mato Grosso. STs belonging to the already described clonal complexes (CC) indicate the global expansion and adaptation of isolates in several other countries. Therefore, detection of clonal complexes and STs already described in other regions and the occurrence of new STs in the present study help further the current understanding of the geographic dispersion and genetic origin of the *C. gattii* species complex.

Keywords: *Cryptococcus gattii*, *Multi-locus Sequence Typing*; Genotyping; Cryptococcosis

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

μl – microlitro

μM – micromolar

AFLP – polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados

AT – *allele type*

CC – complexo clonal

CAP – proteína capsular associada

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CEP-HUJM – Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller

CGB – ágar canavanina glicina azul de bromotimol

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNTP – desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)

GPD- gliceraldeido 3 fosfato desidrogenase

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HUJM – Hospital Universitário Júlio Muller

IGS – espaçador intergenico do RNA ribossomal

ISHAM – sociedade internacional de micoses sistêmica humana e animal

KCl – cloreto de potássio

L – litros

LAC - lacase

M – molar

MgCl₂ – cloreto de magnésio

Min – minutos

MLST – tipagem da sequencia multi-locus

mM – milimolar

MT – Mato Grosso

NaCl – cloreto de sódio

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

PCR-RFLP – análise de polimorfismo de fragmento de restrição

PLB – fosfolipase

qPCR – reação em cadeia pela polimerase em tempo real

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

ST – *sequence type*

UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso

URA – monofosfato de orotidina pirofosforilase

V – voltagem

WGS – *whole genome sequence*

SUMARIO

| | | |
|---|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 13 |
| | 2.1 Etiologia..... | 13 |
| | 2.2 Distribuição..... | 13 |
| | 2.3 Patogenia..... | 14 |
| | 2.4 Diagnóstico..... | 15 |
| | 2.4.1 Fatores de virulência..... | 16 |
| | 2.5 Tratamento e prevenção..... | 18 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 20 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| | 4.2 Isolamento e cultura do gênero <i>Cryptococcus</i> | 21 |
| | 4.3 Isolamento do DNA e PCR..... | 21 |
| | 4.4 Técnica de PCR-RFLP..... | 22 |
| | 4.5 Técnica de MLST..... | 22 |
| | REFERÊNCIAS..... | 24 |
| | APENDICE A – ARTIGO 1..... | 32 |
| | APENDICE B – ARTIGO 2..... | 46 |
| 5 | CONCLUSÕES | 50 |
| | 5.1 Diversidade genética do complexo de espécies de <i>Cryptococcus gattii</i> no Estado de Mato Grosso, Brasil..... | 50 |
| | 5.2 Detecção molecular de <i>Mycobacterium leprae</i> pela técnica de reação pela cadeia em polimerase em animais silvestres de vida livre e cativoiro..... | 50 |

1 INTRODUÇÃO

A criptococose, distribuída mundialmente, afeta humanos e animais imunocompetentes e imunocomprometidos, sendo a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a quimioterapia e o uso de imunossupressores os principais fatores de riscos relacionados a doença nos humanos (FANG; FA; LIAO, 2015; KWON-CHUNG et al., 2014; LEIMANN; KOIFMAN, 2008; PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Estima-se que a incidência global de meningite causada por *Cryptococcus* spp., no ano de 2014, foi de 223.100 casos, o que resultou em 181.100 mortes anuais (RAJASINGHAM et al., 2017).

Caracterizada como uma doença causada por fungos do gênero *Cryptococcus*, controvérsias na nomenclatura das espécies ainda são discutidas na literatura. De acordo com a proposta de Hagen et al (2015), há sete espécies, com exceção dos híbridos diploides/aneuploides, no complexo de espécies *C. neoformans* (*C. neoformans* e *C. deneoformans*) e no complexo de espécies *C. gattii* (*C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*). No entanto, Kwon-Chung et al (2017) dividem o gênero em dois complexos de maior relevância: o complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* e o complexo de espécies *C. gattii*.

Devido a adaptabilidade em zonas temperadas, a expansão do complexo de espécies *C. gattii* ganhou relevância no surto observado em humanos e animais na Ilha de Vancouver (Canadá) em 1999 (CAMPBELL et al., 2015; KIDD et al., 2004; SORREL, 2001). Uma hipótese é que as mudanças climáticas permitiram que essas cepas criptocócicas competissem no microbioma ambiental e, com o aumento da exposição, infectassem os hospedeiros suscetíveis (PERFECT; BICANIC, 2015). Assim, entender como ocorre a dispersão do complexo de espécies *C. gattii* para outros continentes, o ciclo de vida, o curso fatal e sua natureza, é crucial para uma melhor investigação epidemiológica deste micro-organismo (COGLIATI et al., 2013).

Molecularmente, o complexo de espécie pode ser classificado em até 5 principais grupos genéticos, variando de acordo com a ecologia, epidemiologia e a região geográfica (HAGEN et al., 2015). Assim, essa diferenciação na tipagem molecular é necessária para verificar os padrões de distribuição molecular e, conseqüentemente, conhecer os possíveis genes relacionados a virulência e a resistência a drogas (ESPINEL-INGROFF; KIDD, 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

O gênero *Cryptococcus* caracteriza-se por ser uma levedura encapsulada, pertencente ao grupo de basidiomicetos (DEL POETA; CASADEVALL, 2012; PAPPAS, 2013). Embora em raras circunstâncias outras espécies possam causar doença, as de maior relevância são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* (PERFECT; BICANIC, 2015).

Tais espécies podem ser classificadas como 5 distintos genótipos em 7 espécies, excluindo os híbridos, de acordo com a nova proposição de identificação, sendo divididas em: complexo de espécies *C. neoformans* (*C. neoformans*, *C. deneoformans* e híbrido do cruzamento entre os *C. neoformans* e *C. deneoformans*) e o complexo de espécies *C. gattii* (*C. gattii*, *Bacillisporus cryptococcus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*), além dos híbridos derivados do cruzamento dos complexos *C. neoformans* e o *C. gattii* (cruzamento de *C. deneoformans* com *C. gattii*, *C. neoformans* com *C. gattii* e *C. neoformans* com *C. deuterogattii*) (HAGEN et al, 2015). Entretanto, devido à instabilidade nas nomenclaturas, atualmente as espécies do gênero *Cryptococcus* estão de acordo com Kwon-Chung et al. (2017), as quais são divididas em dois complexos de maior relevância “complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*” e “complexo de espécies *C. gattii*”.

2.2 Distribuição

Com distribuição mundial, o complexo de espécies *C. neoformans* está associado às fezes de aves, matéria orgânica em decomposição e solos enriquecidos com excremento de animais, já o complexo de espécies *C. gattii* está associado a árvores, solo e plantas (BIESLKA; MAY, 2016; ELLIS; PFEIFFER, 1990; PAPPAS, 2013; UEIJO et al., 2015). Regiões como América do Sul, América do Norte, Ásia, África, Europa, Oceania e Ilha de Vancouver, já relataram casos de criptococose (COGLIATI et al., 2013). Na América do Sul,

Trilles et al. (2008) identificaram a infecção no Brasil em diversos estados, como Roraima, Amazonas, Piauí, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná. No estado de Mato Grosso, diversos relatos já foram descritos em humanos, animais e no ambiente (ANZAI et al., 2014; FAVALESSA et al., 2009; PAULA et al., 2014). Assim, de acordo com o Ministério da Saúde, dentre as internações decorrente de micoses sistêmicas no Brasil em 2016, a criptococose correspondeu a 8,99% (251/2791) dos casos (BRASIL, 2018).

Em relação a distribuição dos genótipos, mais especificamente, o complexo de espécies *C. gattii* pode ser classificado em VGI-VGIV pela técnica de PCR-RFLP (FRASER et al., 2005). O padrão de distribuição destes genótipos no Brasil, segundo Trilles et al. (2008), mostra que VGI encontra-se nos estados do Rio de Janeiro e Paraná. Nascimento et al (2014) também relataram este mesmo genótipo na região sudeste. Já o VGII foi detectado em Roraima, Amazonas, Piauí, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (TRILLES et al., 2008). Outros estudos também relataram o tipo molecular VGII no estado do Pará, Amazonas e Mato Grosso (ALVES et al., 2016; PAULA et al., 2014; SANTOS et al., 2008). O VGIII foi isolado em Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, enquanto que o VGIV ainda não foi identificado no Brasil (TRILLES et al., 2008). Logo, observa-se que o genótipo VGII está amplamente distribuído no Brasil. Segundo Billmyre et al. (2014), a população de VGII mostra que é um genótipo adaptável, sugerindo que a microevolução pode ter levado a uma maior virulência e expansão desses isolados originando casos de surtos.

2.3 Patogenia

Amplamente difundidos na natureza, os esporos ou leveduras dissecadas do *Cryptococcus* spp. são transportados pelo ar (BIESLKA; MAY, 2016), sendo provável que muitos indivíduos inalem esses propágulos infecciosos, porém somente poucos venham a apresentar uma infecção (D'SOUZA et al., 2004; GIORGI et al., 1974). Para produzirem a infecção ativa, os esporos dependerão da capacidade da germinação antes da ativação e morte dos macrófagos. Assim, uma vez germinadas no hospedeiro, as leveduras podem

crescer tanto intracelularmente como extracelularmente, caracterizando-se como um patógeno intracelular facultativo (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018).

Dessa forma, o grupo de risco para adquirir a criptococose está associado a indivíduos imunossuprimidos, sendo que em humanos as maiores frequências ocorrem em portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pacientes transplantados sob terapia com imunossupressores, com distúrbios de falência de órgãos ou no sistema imunológico inato (PAPPAS, 2013). No entanto, em nível de espécies, relatos descrevem a criptococose causada pelo complexo de espécies *C. neoformans* associada mais a indivíduos imunossuprimidos e, o complexo de espécies *C. gattii*, associado aos imunocompetentes (PAPPALARDO; MELHEM, 2003; ZHANG; PARK; WILLIASOM, 2015).

Diversos fatores estão relacionados a evolução clínica da criptococose, a qual pode ser subaguda ou crônica. Assim, o estado imunológico do hospedeiro, susceptibilidade da população, fatores geográficos ou étnicos e a carga inicial do patógeno estão envolvidos no desenvolvimento da infecção (FANG; FA; LIAO, 2015; GIORGI et al., 1974). Em indivíduos que adquirem a infecção, o primeiro sítio está associado ao pulmão, podendo se disseminar até o sistema nervoso central, causando manifestações como encefalite, meningite e meningoencefalite (forma mais grave da doença) (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; FRANCO-PAREDES, 2015; RAJASINGHAM et al., 2017; ROLSTON, 2013). Esta disseminação das células criptocócicas ocorre pelos vasos sanguíneos, atravessando as barreiras epiteliais e endoteliais para transitar dos alvéolos pulmonares até a corrente sanguínea e, posteriormente, para o SNC (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018).

2.4 Diagnóstico

Para o diagnóstico da criptococose, métodos como isolamento da levedura, exame direto com tinta da Índia, histopatológico, sorologia, cultura e testes bioquímicos, como o Agar Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol, têm sido empregados (GARCÍA; PENAN, 2018; PERFECT; BICANIC, 2015). Técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Análise de Polimorfismo de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP),

detecção por nanopartículas de ouro, sequenciamento do espaçador intergênico, Análise de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) e Tipagem da Sequência Multi-locus (MLST) podem ser utilizados para a confirmação da doença e genotipagem (ESPINEL-INGROFF e KIDD, 2015; MARUYAMA et al., 2017). Assim, métodos que detectam DNA têm se destacado pela sensibilidade e especificidade no diagnóstico (BAKTHAVATHSALAM; RAJENDRAN; MOHAMMED, 2012).

Considerada uma técnica rápida, específica e sensível, a PCR tem sido muito importante na detecção de DNA de diversos micro-organismos. Em relação a detecção molecular de *Cryptococcus* spp., essa técnica permite a diferenciação entre os sorotipos (AOKI et al., 1999). Outra variação da PCR de grande relevância no estudo da criptococose é pela técnica de PCR-RFLP, a qual permite a classificação genotípica, de VNI, VNII, VNB e VNIV para o complexo *C. neoformans* e, para *C. Gattii*, de VGI-VGIV (DOU et al., 2015, LITVINTSEVA et al., 2006; MEYER et al., 2009; MUÑOZ et al., 2018). Esta técnica baseia-se na amplificação pelo PCR do gene *URA5* e no uso de duas enzimas de digestão. Os produtos da digestão são visualizados e comparados com os perfis das cepas padrão já descritos na literatura (MEYER et al., 2003)

Já a técnica MLST, permite a melhoria na identificação taxonômica e genética (PERFECT; BICANIC, 2015). Nesta, segue-se um consenso de acordo com a “International Society for Human and Animal Mycology” (ISHAM), no qual são incluídos 6 genes *housekeeping* (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*) e o espaçador intergênico, *IGS1*, o qual foi selecionado com base na sua alta diversidade alélica.

Logo, o uso da técnica de MLST pode permitir a identificação dos alelos associados com patogenicidade e virulência, objetivando identificar alvos que contribuam para a melhoria do tratamento (BEALE et al., 2015). Por meio desta técnica, pode-se pressupor que a variabilidade genética, decorrente da reprodução sexual e de eventos de recombinação gênica, facilite a dispersão e propagação da levedura. Isso contribui para o desenvolvimento e persistência de um surto, devido a interação entre espécies ou linhagens que favorecem a troca genética como uma estratégia de proliferação mesmo em condições de mudança (MUNOZ et al., 2018; SPRINGER et al., 2014). Segundo Munoz et al. (2018), é uma técnica considerada de fácil acesso, especialmente em países de baixa renda, onde o sequenciamento do genoma inteiro “Whole Genome Sequence” (WGS) ainda é restrito, necessitando apenas de bioinformática básica. Em comparação com o WGS, o MLST

possui um banco de dados com os isolados de diferentes origens e alto poder discriminatório entre os diferentes tipos moleculares do complexo de espécies *C. neoformans* e complexo de espécies *C. gattii* (MUNÓZ et al., 2018).

2.4.1 Fatores de virulência

Dos 6 genes *housekeeping*, três genes estão relacionados aos principais fatores de virulência envolvidos no desenvolvimento da infecção criptocócica, como a cápsula polissacarídeo (*CAP59*), a síntese de melanina (*LAC1*) e invasão celular (*PLB1*) (MEYER et al., 2009). Segundo Bielska e May (2016), a cápsula polissacarídeo, melanina, a presença da quitina na parede celular, fosfolipases, urease, lacase e a capacidade de crescimento a 37°C têm sido os fatores de virulência mais estudados. Esses dados corroboram com o estudo de Barcellos et al. (2018), os quais associam isolados hipervirulentos a maior pigmentação, diferenças na produção de melanina, na estrutura capsular e na atividade da urease.

Assim, a cápsula de polissacarídeo é a primeira estrutura que interage com as células hospedeiras, sendo que durante o curso da infecção, pode haver mudanças imunogênicas da cápsula, sendo característico para a adaptação e sobrevivência no hospedeiro (ZARAGOZA et al., 2009). Tanto a parede celular como a cápsula sintetizada pelos fungos, são estruturas que protegem os micro-organismos dos ataques do hospedeiro, facilitando a propagação de fungos nos tecidos (ZARAGOZA et al., 2009).

Outro fator importante na virulência está relacionado ao gene lacase, o qual está associado a produção de melanina (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; ITO-KUWA et al., 2008; SALAS et al 1996). Presente na parede celular dos fungos, esse pigmento é responsável por fornecer um escudo protetor contra o sistema imunológico, além de proteger da radiação ionizante, luz ultravioleta e mecanismos de oxidação (EISENMAN; CASADEVALL, 2012; ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018). A produção de melanina que se deposita na parede do fungo é proveniente de substratos contendo dopamina e da ação de enzimas catalizadoras como a fenoxidase (ZARAGOZA et al., 2009).

Responsável pela proliferação e sobrevivência dentro do macrófago, o gene fosfolipase é responsável por contribuir para a disseminação da levedura no organismo do hospedeiro e atingir o SNC (EVANS et al., 2015). A habilidade do *Cryptococcus* crescer nos fagolisossomas mostra a capacidade de sobreviver aos antifúngicos e adquirirem nutrientes para a proliferação (JHONSTON; MAY, 2013).

Atuando na proteção contra a morte oxidativa por fagócitos, o gene superóxido dismutase (SOD), caso sofra deleção, reduzirá vários fatores relacionados à virulência, o que interfere na atividade da lacase, urease e fosfolipase (NARASIPURA, et al., 2003). Além disto, o gene SOD atua como componente da resposta antioxidante das mitocôndrias, permitindo o crescimento em altas temperaturas (GILES et al., 2006). Assim, a capacidade de crescer a 37°C contribui para a patogênese deste micro-organismo, pois a exposição prolongada a ambientes de alta temperatura, torna-se essencial para a evolução e a manutenção da patogenicidade deste micro-organismo em hospedeiros mamíferos (XU, 2004).

Para facilitar a disseminação da levedura para o SNC, a urease atua nos mecanismos de transporte dependentes de macrófagos, influencia no crescimento intracelular e confere a levedura o potencial de hidrolisar a ureia em amônia, a qual servira como fonte de nitrogênio (FU et al., 2018). Além disto, segundo Olszewski et al (2004), a amônia pode ser tóxica, o que compromete a função das células endoteliais, permitindo atravessar a barreira hematoencefálica.

2.5 Tratamento e Prevenção

Com relação ao tratamento, o sucesso está relacionado com a eficácia do diagnóstico, o qual necessita de rapidez e precisão, além da discriminação de outras espécies de leveduras patogênicas (MARUYAMA et al., 2017). Dentre os antifúngicos, os principais empregados na terapia são cetoconazol, itraconazol, voriconazol, fluconazol, anfotericina-B e 5-fluocitosina, esses dois últimos associados ou não (ARCHIBALD et al., 2004; BERTOUT et al., 2013; GUTCH et al., 2015; PERFECT; BICANIC, 2015). No Brasil, para o tratamento de micoses sistêmicas, são preconizados o uso de Anfotericina B (complexo

lipídico) 5mg/mL, Fluconazol 2mg/mL e Itracozanol (100mg) (BRASIL, 2018). No entanto, o diagnóstico incorreto, confundido muitas vezes com outras infecções pulmonares virais, bacterianas ou mesmo fúngicas, dificultam o tratamento precoce da criptococose (BIESLKA; MAY, 2016), levando à sérias complicações.

Além disto, a identificação a nível de espécie e genótipo podem contribuir para a melhor escolha de tratamento. Trilles et al (2012) identificaram variações na susceptibilidade a antifúngicos entre os complexos de espécies *C.neoformans* e *C. gattii* e, também entre os subgenótipos, relatando a maior resistência a azóis no genótipo VGII em relação aos genótipos VGI, VNI e VNIV. Segundo Del Poeta et al. (1999), o uso inadequado de a antifúngicos pode gerar resistência a drogas, devido aos possíveis eventos de deleções, transposições, mutações e recombinações que podem ocorrer, sugerindo que novos agentes antifúngicos sejam necessários para um tratamento efetivo da criptococose sistêmica. Em alguns casos, tratamento cirúrgico para a remoção de criptococomas também pode ser realizado (CHEN; MEYER; SORREL, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde, não há medidas preventivas específicas, no entanto, recomenda-se o controle populacional de pombos (reduzir alimento, água e abrigo), uso de equipamento individual na limpeza de galpões, onde há criação de aves ou aglomerados de pombos (BRASIL, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo, investigar a diversidade molecular do complexo de espécie de *C. gattii* no Estado de Mato Grosso, Brasil e compreender a dinâmica da distribuição desta levedura em uma região que é influenciada por diferentes biomas.

3.2 Objetivo específico

- Verificar o padrão de distribuição dos genótipos do complexo de espécie *C. gattii* pela técnica PCR-RFLP no Estado de Mato Grosso, Brasil.
- Investigar a diversidade molecular do complexo de espécie *C. gattii* pela técnica de MLST no Estado de Mato Grosso, Brasil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e cultura do gênero *Cryptococcus*

Os isolados, oriundos de coletas ambientais, da rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso bem como do Hospital Universitário Júlio Muller (certificado do Comitê de ética animal n°23108.100659/2015-57 e humano n°888/CEP-HUJM/2012), foram obtidos durante o período de novembro de 2010 até dezembro de 2017. O isolamento de culturas suspeitas do gênero *Cryptococcus* foi feito em meio ágar *Sabourad* dextrose 2%, ágar *Sabourad* dextrose acrescido de cloranfenicol (0,05g/L) e ágar Níger (*Guizotia abyssinica*) (SHIELDS; AJELLO, 1966). O material foi semeado a 30°C e 37°C e observado diariamente durante 7 dias e, posteriormente, foi empregado o método de coloração com tinta de nanquim para a análise da morfologia microscópica e o teste bioquímico em ágar CGB (L-Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol).

5.2 Isolamento do DNA e PCR

Para a caracterização molecular, os isolados de *Cryptococcus* spp. foram semeados em ágar *Sabouraud* a 30°C por 48h. Após o crescimento, foi retirado uma alçada de cada isolado e transferidos para um microtubo de 2mL contendo 500 µl de tampão de extração, seguindo a extração de DNA com pérolas de vidro e fenol/clorofórmio, conforme descrito por Del Poeta et al (1999). O material foi armazenado à -20°C para a utilização nos testes moleculares.

Posteriormente, foi realizada a técnica de PCR para identificação dos isolados seguindo o protocolo de Aoki et al (1999). Para determinar a espécie dos isolados foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores CNA 70A (5'-ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3') e CNA 70S (5'-ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC-3'), específicos para o complexo de espécies *C. neoformans* e, CNB 49A (5'-

ATTGCGTCCATCCAACCGTTATC-3') e CNB 49S (5'-ATTGCGTCCAAGTGTTGTTG-3'), específicos para o complexo de espécies *C. gattii*, que originam produtos de 695 pb e 448 pb, respectivamente. Para identificação dos genes SOD1 (superóxido dismutase) e confirmação do complexo de espécies *C. gattii*, a PCR foi feita de acordo com D'Souza et al (2004). Os produtos de amplificação, corados com *Gel Red* (Biotium), foram submetidos a eletroforese em gel agarose 1,5% a 100 V por 90 min e visualizados no ChemiDoc™ XRS utilizando o *software* ImageLab™®.

5.3 Técnica de PCR-RFLP

A técnica RFLP para a genotipificação foi realizada de acordo com Meyer et al (2003). Primeiramente foi realizada uma amplificação de um fragmento do gene URA5 através da PCR. Posteriormente, esses produtos de amplificação foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição *Sau96I* (10 U/L) e *HhaI* (20 U/μl) durante 3 horas e separado por eletroforese em gel de agarose (3%). Os padrões de RFLP foram atribuídos por comparação com perfil de bandas das cepas referências (VNI-VNIV e VGI-VGIV) (MEYER et al., 2003).

5.4 Técnica de MLST

Na técnica MLST para isolados do complexo de espécies *C. gattii*, utilizou-se sete *locus* genéticos (CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 e IGS1) para distinguir cepas intimamente relacionadas de acordo com Meyer et al (2009). O fragmento de cada *locus* amplificado foi purificado utilizando-se o *kit* GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Posteriormente, as amostras foram sequenciadas no automático ABI-PRISM 3500 Genetic, de acordo com as recomendações do fabricante.

As sequências foram editadas e comparadas com as sequências de cada *locus* publicadas no banco de dados do MLST do complexo de espécies *C. gattii*

(<http://mlst.mycologylab.org>) (DOU et al., 2015). Para cada *locus*, um número de alelo foi atribuído a cada sequência diferente. No entanto, um novo número foi fornecido para as sequências ainda não existentes. Cada combinação única de alelos, denominado “Allele Type” (AT) ou “Sequence Type” (ST) gerou um número de identificação já correspondente ou dado um novo número, caso ainda não tenha a combinação no banco de dados ou pelo surgimento de um novo alelo. Posteriormente, os STs foram analisados no software goeBurst para melhor compreensão da distribuição e possível identificação do ancestral comum dos isolados.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G.S.B.; FREIRE, A.K.L.; BENTES, A.S.; PINHEIRO, J.F.S., SOUZA, J.V.B.; WANKE, B.; MATSUURA, T.; JACKISCH-MATSUURA, A.B. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v.59, p.509-515, 2016.
- ANZAI, M. C.; LAZERA, M. S.; WANKE, B.; TRILLES, L.; DUTRA, V.; PAULA, D. A. J.; NAKAZATO, L.; TAKAHARA, D. T.; SIMI, W. B.; HAHN, R. C. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 7, p. 414-418, 2014.
- AOKI, F. H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N. F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z.; BRANCHINI, M. L. M. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 315-320, 1999.
- ARCHIBALD, L. K.; TUOHY, M. J.; WILSON, D. A.; NWANYANWU, O. KAZEMBE; P. N.; TANSUPHASAWADIKUL, S.; EAMPOKALAP, B.; CHAOVAVANICH, A. RELLER, L.; JARVIS, W. R.; HALL, G. S.; PROCOP, G. W. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans*. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.1, 2004.
- BAKTHAVATHSALAM, P.; RAJENDRAN, V. K.; MOHAMMED, J. A. B. A direct detection of *Escherichia coli* genomic DNA using gold nanoprobe. **Journal of Nanobiotechnology**, v.10, n.8, p.1-10, 2012.
- BARCELLOS, V. A.; MARTINS, L.M.S.; FONTES, A.C.L.; REUWSAAT, J.C.V.; SQUIZANI, E.D.; ARAÚJO, G.R.S.; FRASES, S.; STAATS, C.C.; SCHANK, A.; KMETZSCH, L.; VAINSTEINS, M.H. Genotypic and phenotypic diversity of *Cryptococcus gattii* VGII clinical isolates and its impact on virulence. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p.132, 2018.
- BEALE, M.A.; SABIITI, W.; ROBERTSON, E.J.; FUENTES-CABREJO, K.M.; O'HANLON, S.J.; JARVIS, J.N.; LOYSE, A.; MEINTJES, G.; HARRISON, T.S.; MAY, R.C.; FISHER, M.T. BICANIC, T. Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.6, 2015.

BERTOOUT, S.; DRAKULOVSKI, P.; KOUANFACK, C.; KRASTEVA, D.; NGOUANA, T.; DUNYACH-RE'MY, C.; DONGTSA, J.; AGHOKENG, A.; DELAPORTE, E.; KOULLA-SHIRO, S.; REYNES, J.; MALLIE, M. Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, n.8, 2013.

BIESLKA, E.; MAY, R.C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**, v.16, 2016.

BILLMYRE, R.B.; CROLL, D.; Li, W.; MIECZKOWSKI, P.; CARTER, D.A.; CUOMO, C.A.; KRONSTAD, J.W.; HEITMAN, J. Highly Recombinant VGII *Cryptococcus gattii* Population Develops Clonal Outbreak Clusters through both Sexual Macroevolution and Asexual Microevolution. **mBio**, v.5, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Saúde de A-Z. **Criptococose: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. 2019. Acessado em: portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/criptococose.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Elenco de referência nacional do componente estratégico da assistência farmacêutica**. 2018.

CAMPBELL, L.T.; SIMONIN, A.R.; CHEN, C.; FERDOUS, J.; PADULA, M.P.; HARRY, E.; HOFER, M.; CAMPBELL, I.L. CARTER, D. A. *Cryptococcus* strains with different pathogenic potentials have diverse proteins secretomes. **Eukaryot Cell**, v.14, p.554-563, 2015.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, 2014.

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

D'SOUZA, C. A.; HAGEN, F.; COX, T. B. G. M.; HEITMAN, J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. **Current Genetics**, v. 46, p. 92-102, 2004.

DEL POETA, M.; TOFFALETTI, D. L.; RUDE, T. H.; DYKSTRA, C. C.; HEITMAN, J.; PERFECT, J. R. Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. **Genetics**, v.152, p.167-178, 1999.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Then challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v.173, p.303-310, 2012.

DOU, H. T.; XU, Y. C.; WANG, H. Z.; LI, T. S. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, p. 753-763, 2015.

EISENMAN, H.C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.93, n.3, p.931-940, 2012.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.7, p.1642-1644, 1990.

ESHER, S.K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J.A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.113, n.7, 2018.

ESPINEL-INGROFF, A.; KIDD, S.E. Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada. **Infection and Drug Resistance**, v.8, p.89-97, 2015.

EVANS, R.J.; LI, Z.; HUGHES, W.S.; DJORDJEVIC, J.T.; NIELSEN, K.; MAY, R.C. Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during Mmrophage infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n.4, p.1296-1304, 2015.

FANG, W.; FA, Z.; LIAO, W. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. **Fungal Genetics and Biology**, v.78, p.7-15, 2015.

FAVALESSA, O. C.; RIBEIRO, L. C.; TADANO, T. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade in vitro a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 661-665, 2009.

FRANCO-PAREDES, C.; WOMACK, T.; BOHLMeyer, T.; SELLERS, B.; HAYS, A.; PATEL, K.; LIZARAZO, J.; LOCKHART, S. R.; SIDDIQUI, W.; MARR, K. A. Management

of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 348-355, 2015.

FRASER, J.A.; GILES, S.S.; WENINK, E.C.; GEUNES-BOYER, S.G.; WRIGHT, J.R.; DIEZMANN, S.; ALLEN, A.; STAJICH, J.E.; DIETRICH, F.S.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nature**, v.437, p.1360-1364, 2005.

FU, M.S.; COELHO, C.; LEON-RODRIGUEZ, C.M.; ROSSI, D.C.P.; CAMACHO, E.; JUNG, E.H.; KULKARNI, M.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **Plos Pathogens**, v.14, n.6, 2018.

GARCÍA, J.; PENAN, J. Diagnóstico microbiológico de las micosis invasoras. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.35, n.4, p.179-185, 2018.

GIORGI, D. F.; REIS, J. B.; BEI, A.; FILHO, J. B. R. Criptococose do sistema nervoso central. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.32, n.2, 1974.

GILES, S.S.; STAJICH, J.E.; NICHOLS, C.; GERRALD, Q.D.; ALSPAUGH, J.A.; DIETRICH, F. PERFECT, J.R. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. **Eukaryot Cell**, v.5, n.9, p.1447-1459, 2006.

GUTCH, R. S.; NAWANGE, S. R.; SINGH, S. M.; YADU, R.; TIWARI, A.; GUMASTA R; KAVISHWAR, A. Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1125-1133, 2015.

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

ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; VALDERRAMA, B.; AOKI, S.; VIDOTTO, V.; OSAFUNE, T. Diversity of laccase among *Cryptococcus neoformans* serotypes. **Microbiology and Immunology**, v.50, p.492-498, 2008.

JOHNSTON, S.A.; MAY, R.C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**, v.15, n.3, p.403-411, 2013.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M.; ... MEYER, M. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.49, p.17258–17263, 2004.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; WICKES, B. L.; MEYER, W.; CUOMO, C. A.; WOLLENBURG, K. R.; BICANIC, T. A.; CASTAÑEDA, E.; CHANG, Y. C.; CHEN, J.; COGLIATI, M.; DROMER, F.; ELLIS, D.; FILLER, S. G.; FISHER, M. C.; HARRISON, T. S.; HOLLAND, S. M.; KOHNO, S.; KRONSTAD, J. W.; LAZERA, M.; LEVITZ, S. M.; LIONAKIS, M. S.; MAY, R. C.; NGAMSKULRONGROJ, P.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; RICKERTS, V.; SORRELL, T. C.; WALSH, T. J.; WILLIAMSON, P. R.; XU, J.; ZELAZNY, A. M.; CASADEVALL, A. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **mSphere**, v.2, n.1, p.e00357-16, 2017.

KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z.; JABON, G.; IDNURM, A. BAHN, Y. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspective in Medicine**, v.4, n.7, p. 1-27, 2014.

LEIMANN, B. C. Q.; KOIFMAN, R. J. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 11, p. 2582-2592, 2008.

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

MARUYAMA, F.H.; PAULA, D.A.J.; MENEZES, I.G.; FAVALESSA, O.C.; HAHN, R.C.; ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUSA, V.R.F.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Genetic diversity of the *Cryptococcus gattii* species complex in Mato Grosso State, Brazil. **Mycopathologia**, 2017.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E.; GROUP, I. C. S. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189-195, 2003.

MEYER, W.; AANENSEN, D. M.; BOEKHOUT, T.; COGLIATI, M.; DIAZ, M. R.; ESPOSTO, M. C.; FISHER, M.; GILGADO, F.; HAGEN, F.; KAOCHAROEN, S.; LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G.; SIMWAMI, S. P.; TRILLES, L.; VIVIANI, M. A.; KWON-CHUNG, J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medicine of Mycology**, v. 47, n. 6, p. 561-570, 2009.

MUNÓZ, M.; CAMARGO, M.; RAMÍREZ, J.D. Estimating the intra-taxa diversity, population genetic structure, and evolutionary pathways of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Genetics**, v.9, n.148, 2018.

NARASIPURA, S.D.; AULT, J.G.; BEHR, M.J.; CHATUVERDI, V.; CHATUVERDI, S. Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. **Molecular Microbiology**, v.47, n.6, p.1681-1694, 2003.

NASCIMENTO, E.; SILVA, M.E.N.B.; MARTINEZ, R.; KRESS, M.R.C.Z. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus gattii* molecular type VGI in Brazil: a case report and review of literature. **Mycoses**, v.57, n.7, p.442-447, 2014.

OLSZEWSKI, M.A.; NOVERR, M.C.; CHEN, G.; TOEWS, G.B.; COX, G.M.; PERFECT, J.R.; HUFFNAGLE, G.B. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, v.164, n.5, 2004.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.6, p.299-305, 2003.

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

PAULA, D. A. J.; ALMEIDA, A. B. P. F.; CRUZ, F. S.; FURLAN, F. H.; COLODEL, E. M.; SOUSA, V. R. F.; DUTRA, V. Occurrence and molecular characterization of cryptococcosis in dogs and cats in Mato Grosso, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p.167-172, 2014.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetic Biology**, v. 78, p. 49-54, 2015.

RAJASINGHAM, R.; SMITH, R.M.; PARK, B.J.; JARVIS, J.N. GOVENDR, T.M. CHILLER, T.M.; DENNING, D.W.; LYSE, A.; BOULWARE, D.R. Global burden of disease of HIB-associated cryptococcal meningitis: na updated analysis. **Lancet Infectious Disease**, v.17, p.873-881, 2017.

ROLSTON, K. V. I. Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 552-554, 2013.

SALAS, S.D.; BENNETT, J.E.; KWON-CHUNG, K.J.; PERFECT, J.R.; WILLIAMSON, P.R. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.184, p.377–386, 1996.

SANTOS, W.R.A.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S.P.S.E.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J.L.M.; MEDEIROS, R.; MORALES, B.P.; BEZERRA, C.C.F.; MACÊDO, R.C.L.; FERREIRA, S.O.; BARBOSA, G.G.; PEREZ, M.A.; NISHIKAWA, M.M.; LAZÉRA, M.S. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.8, p.813-818, 2008.

SHIELDS, A. B.; AJELLO, L. Medium para isolamento seletivo de *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 151, n. 3707, p. 208-209, 1966.

SORREL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Micology**, v.39, n.2, p.155-168, 2001.

SPRINGER, D.J.; BILLMYRE, R.B.; FILLER, E.E.; VOELZ, K.; PURSALL, R.; MIECZKOWSKIS, P.A.; LARSEN, R.A.; DIETRICH, F.S.; MAY, R.C.; FILLER, S.G.; HEITMAN, J. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the Local environmental source as arboreal. **PLoS Pathogens**, v.10, n.8, 2014.

TRILLES, L.; LÁZERA, M. S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R. V.; BARBOSA, G. G.; NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *C. neoformans* and *C. gattii* in Brazil. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455-462, 2008.

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

UEIJO, C.K.; MAK, S.; MANANGAN, A.; LUBER, G.; BARTLETT, K.H. Climatic Influences on *Cryptococcus gattii* Populations, Vancouver Island, Canada, 2002–2004, v.21, n,11, 2015.

XU, J. Genotype-Environment Interactions of Spontaneous Mutations for Vegetative Fitness in the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v.168, n.3, p.1177-1188, 2004.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M.L.; JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiology*, v.68, p.133-216, 2009.

ZHANG, N.; PARK, Y.; WILLIAMSON, P. R. New technology and resources for cryptococcal research. **Fungal Genetics and Biology**, 2015.

APENDICES

APENDICE A - ARTIGO 1

Mycopathologia
<https://doi.org/10.1007/s11046-018-0313-2>



SHORT COMMUNICATION

Genetic Diversity of the *Cryptococcus gattii* Species Complex in Mato Grosso State, Brazil

Fernanda Harumi Maruyama · Daphine Ariadne Jesus de Paula ·
Isabela de Godoy Menezes · Olívia Cometti Favalessa · Rosane Christine Hahn ·
Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida · Valéria Régia Franco Sousa ·
Luciano Nakazato · Valéria Dutra

Received: 11 September 2018 / Accepted: 7 December 2018
© Springer Nature B.V. 2019

ABSTRACT

Cryptococcosis is caused by fungi of the genus *Cryptococcus*. Owing to its importance, this study aimed to analyze the genetic diversity of *C. gattii* isolates from animals, humans, and the environment in Mato Grosso State (MT), Brazil, during November 2010–December 2017. All isolates of the *C. gattii* species complex were subjected to molecular genotyping via Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP) and Multi-locus Sequence Typing (MLST). PCR–RFLP analysis revealed that 21 isolates presented the genotype VGII, which is considered the most common and virulent genotype globally among. MLST analysis revealed the presence of 14 sequence types (STs), of which 5 are considered new genotypes. Clonal Complex (CC) CC182 ($n = 5$; 23,80%) and CC309 ($n = 3$; 14,28%) were the most frequent. CC distribution in relation to origin revealed that three CCs were found in animals with a predominance of CC182 (66,66%), while nine were found in humans, and two CCs were found in the environment. Extensive genetic variability was observed among the isolates in the State of Mato Grosso. STs belonging to the already described clonal complexes (CC) indicate the global expansion and adaptation of isolates in several other countries. Therefore, detection of clonal complexes and STs already described in other

regions and the occurrence of new STs in the present study help further the current understanding of the geographic dispersion and genetic origin of the *C. gattii* species complex.

Keywords: *Cryptococcus gattii*, Multi-locus Sequence Typing; Genotyping; Cryptococcosis.

1. INTRODUCTION

Cryptococcosis is a disease caused by fungi of the genus *Cryptococcus*, affecting immunocompetent and immunocompromised humans and animals. The estimated of the global incidence, in 2014, of cryptococcal meningitis to be substantial at 223,100 cases annually, resulting in 181,100 annual deaths [1–3]. Owing to nomenclatural controversy, the species of the genus *Cryptococcus* can be classified in accordance with Kwon-Chung et al. [4] and are divided in two complexes of greater relevance: the “*Cryptococcus neoformans* species complex” and “*C. gattii* species complex.” Accurate taxonomy was proposed by Hagen et al [3], that recognized seven species, excluding diploid/aneuploid hybrids, in the *C. neoformans* species complex (*C. neoformans* and *C. deneoformans*) and *C. gattii* species complex (*C. gattii*; *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* and *C. decagattii*).

The *C. gattii* species complex has been extensively studied because studies have indicated their expansion to temperate regions, wherein they were previously associated with tropical and subtropical climates [5, 6]. Considered rare, this *C.gattii* species complex gained importance in an outbreak in humans and animals on Vancouver Island (Canada) in 1999 [7].

At the molecular level, the *C. gattii* species complex can be classified into five main genetic groups with varying ecology and epidemiology in accordance with the geographic region [3]. The differentiation and molecular typing of these species, using methods including Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis (AFLP), and Multi-Locus Sequence Typing (MLST) [8], are necessary to verify the distributions of their molecular patterns and, consequently, to provide knowledge regarding possible virulent genes and drug resistance [3].

This study aimed to investigate the molecular diversity of *C. gattii* species complex in Mato Grosso (MT) state, Brazil. This geographic location, with different biomes in the region, which favors high genetic variability among isolates of the *C. gattii* species complex, can

further the current understanding of the dynamic distribution of this yeast and to the prevention and effective control of this disease.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Isolation and culture of genus *Cryptococcus*

Isolates were obtained from samples sent to the routine of the Veterinary Hospital of the Federal University of Mato Grosso (UFMT) as well as the University Hospital of Julio Muller. It was carried out from November 2010 to December 2017. The environmental isolates were incubated by the Mycology Laboratory (UFMT). Routinely, the isolation of cultures suspects of genus *Cryptococcus* was cultured on Sabouraud dextrose agar 2%, Sabouraud dextrose agar plus chloramphenicol (0.05 g/L), and niger seed agar (*Guizotia abyssinica*) [9]. The material was incubated at 30°C and 37°C and evaluated daily for 7 d, followed by morphological evaluation using India ink for microscopic morphological analysis and biochemical test on CGB agar (LCanavanine– Glycine–Bromothymol blue).

2.2 DNA isolation and PCR

For molecular characterization, the isolates of genus *Cryptococcus* were incubated on Sabouraud dextrose agar at 30°C for 48 h. After sample growth, DNA was extracted from each isolate and transferred to a 2-mL microtube containing 500 µl of extraction buffer, followed by glass pearls and phenol/chloroform, as described by Del Poeta et al [10]. The material was stored at -20°C for use in molecular testing.

Subsequently, PCR was performed to identify the isolates in accordance with the protocol of Aoki et al [11]. CNA 70A and CNA 70S oligonucleotide pairs specific for *C. neoformans* species complex, and CNB 49A and CNB 49S specific for the *C. gattii* species complex, were used to determine the species of the isolates, by amplifying products of 695 bp and 448 bp, respectively. For the identification of the *SOD1* (superoxide dismutase) gene and confirmation of the *C. gattii* species complex, PCR was performed as described by D'Souza et al [12]. Amplification products, stained with Gel Red (Biotium), were subjected

to 1.5% agarose gel electrophoresis at 100 V for 90 min and visualized on ChemiDoc™ XRS using ImageLab™ software.

2.3 PCR-RFLP technique

PCR-RFLP analysis for genotyping was performed in accordance with the method of Meyer et al [13]. The amplification products of the *URA5* gene were double digested with *Sau96I* (10 U/L) and *HhaI* (20 U/μl) for 3 h and separated by electrophoresis on agarose gel (3%). PCR-RFLP patterns were attributed by comparison with band-profile strain references (VNI-VNIV and VGI-VGIV) [13].

2.4 MLST technique

In the MLST for isolates of the *C. gattii* species complex, seven genetic loci (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*, and *IGS1*) were used to distinguish the closely related strains as described by Meyer et al [14]. Each amplified locus was purified using the GFX™ PCR kit DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Subsequently, the samples were sequenced on the automatic ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer.

2.5 Software analysis

The sequences were trimmed and compared to sequences from each locus published in the MLST database of the *C. gattii* species complex (<http://mlst.mycologylab.org>) [15]. Subsequently, STs were analyzed in goeBurst software to better comprehend the distribution and possible identification of a common ancestor of the isolates.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Isolation and culture of genus *Cryptococcus*

Of the 21 isolates, 13 (61.90%) were from humans, six (28.57%) were from animals, and two (9.52%) were from environmental samples. Indian ink was used to observe the capsule of the genus *Cryptococcus*. All the samples on CGB agar were positive and confirmed via PCR analysis. In humans, 11 (84.61%) samples were from neurological cases, 1 (7.69%) was from a pulmonary case, and 1 (7.69%) was from a case showing both clinical forms. The animal isolates had (dog, cat, and guinea pig) lesions on the nose or skin and, to a lesser extent, the neurologic form (Table 1).

Table 1 Characteristics of *C. gattii* species complex isolates during the years 2010–2017 from humans, animals, and the environment in the State of Mato Grosso, Brazil

| Id isolates | Year | Source | Clinical signs | City | URA5-RFLP | MLST | CC |
|-------------|------|----------------|---------------------------------------|---------------|-----------|-------------------|---------|
| 53 | 2012 | Human | Neurocryptococcosis | Várzea Grande | VGII | 20 | 20 |
| MASC | 2010 | Human | Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 20 | 20 |
| 3174 | 2012 | Human | Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 40 | 40 |
| 2416 | 2011 | Human | Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 46 | *(46) |
| M953-16 | 2016 | Human | Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 182 | 182 |
| 3330 | 2013 | Human | Pulmonary cryptococcosis | Cuiabá | VGII | 306 | Sg(306) |
| 741-05 | 2010 | Human | Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 306 | Sg(306) |
| 987-08 | 2010 | Human | Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 309 | *(309) |
| 2285 | 2011 | Human | Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 309 | *(309) |
| 638-08 | 2010 | Human | Pulmonary and Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 316 | *(316) |
| 96-06 | 2010 | Human | Cryptococcal meningitis | Cuiabá | VGII | 485 ^b | *(485) |
| 623-06 | 2010 | Human | Cryptococcal meningitis | Sinop | VGII | 487 ^b | 40 |
| 741-06 | 2010 | Human | Neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 488 ^{ab} | *(488) |
| 662 | 2011 | Canine | Apathy and increased abdominal volume | Sinop | VGII | 182 | 182 |
| 142 | 2012 | Feline | Pulmonary cryptococcosis | Cuiabá | VGII | 182 | 182 |
| M638-17 | 2017 | Guinea pig | Nasal injury | Cuiabá | VGII | 182 | 182 |
| 865-11 | 2011 | Canine | Skin injury | Cuiabá | VGII | 489 ^b | 182 |
| 147 | 2012 | Feline | Nasal injury | Cuiabá | VGII | 309 | *(309) |
| M226-16 | 2016 | Feline | Skin injury and neurocryptococcosis | Cuiabá | VGII | 486 ^{ab} | Sg(486) |
| 148C | 2014 | Public Library | Nd* | Cuiabá | VGII | 264 | Sg(264) |
| 12 | 2010 | Tree | Nd* | Cuiabá | VGII | 310 | Sg(310) |

*Do not have founder defined

Nd* Nothing to declare

Sg Singletons

^aNew allele

^bNew ST

a. PCR-RFLP analysis

PCR-RFLP analysis revealed that all the isolates belonged to genotype VGII. In previous reports, genotype VGI was considered the most frequent; however, currently, VGII has been the most commonly found genotype in global isolates [16]. This genotype is distributed worldwide and has been described as the most virulent strain responsible for infections in both immunocompetent and immunocompromised humans and animals [17,18]. In animals, the importance of isolating this genotype can contribute to the identified the sentinel markers of the disease and verify that this genotype can adapt to several hosts, thus increasing its dispersion.

Associated with the outbreak on Vancouver Island, Canada, it is believed that the evolutionary origin of this molecular type may be traced to South America, adapting to the temperate zones [19,20,21]. Hagen et al [18] reported that phylogenetic and recombination analysis (AFLP and SCAR-MLST) suggested that the oldest lineage originated in Brazil, where the Amazon region is the most plausible for the origin of the VGII genotype, causing outbreaks in British Columbia (Canada) and the Pacific Northwest (USA) and cases in Australia. The first VGII isolate (LMM 293) identified in Brazil was in the state of Rio de Janeiro in 1988, from a patient in the Northern region of the country [22]. The genotype was also described in the Northeast, South, Southeast, and Mid-West Brazil [22,23,24,25,26].

b. Analysis of MLST technique

Genotyping analysis of 21 isolates via MLST revealed a considerable genetic diversity in comparison with PCR-RFLP analysis. The presence of 14 STs was observed, of which 5 are considered new (ST 485, ST 486, ST 487, ST 488, and ST 489). These STs are distributed in 12 Clonal Complexes and four were "Singletons" (Figure 1). Several genotypes were verified in Brazil and these new STs probably resulted from clonal propagation or genetic recombination [25,27]. Furthermore, Lockhart et al [28] affirmed the existence of a large genetic diversity that according to Souto et al [25], results from the ability to emerge from the original habitat, adaptation, and colonization of new environments and hosts.

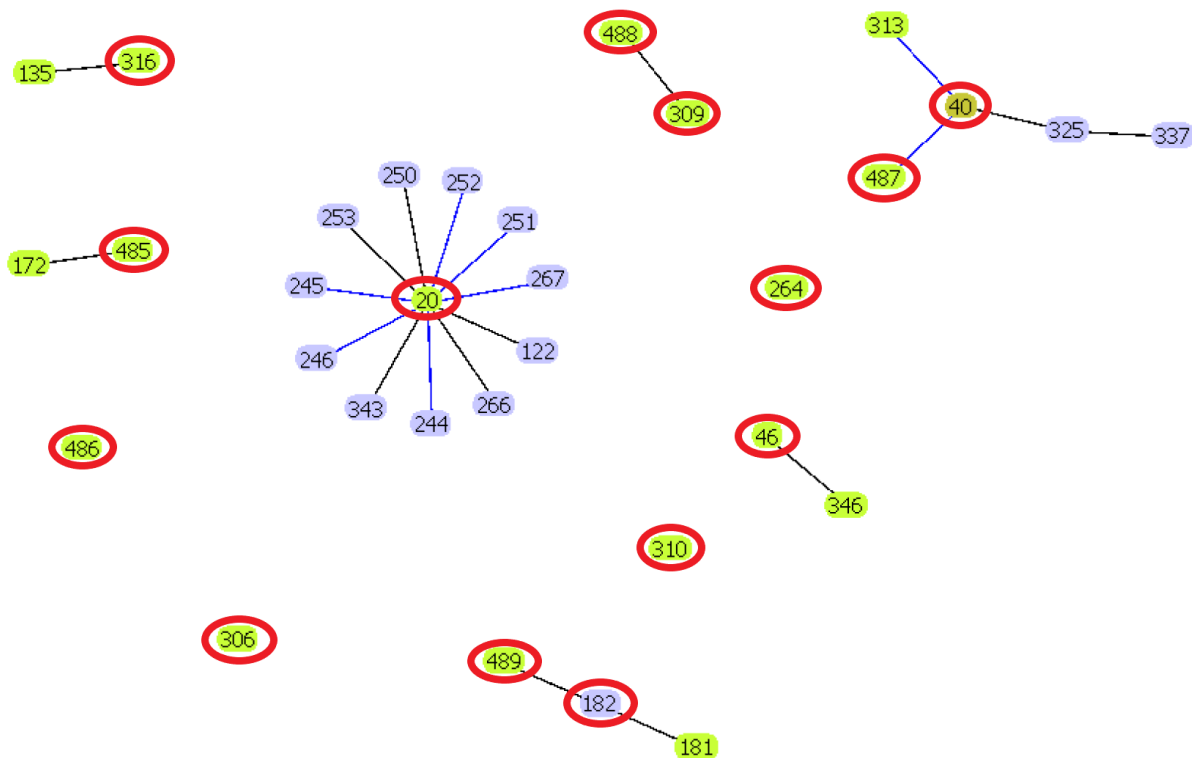


Fig 1 - Analysis of isolates from the State of Mato Grosso, using the goeBurst software showing the sequence typing, formation of the clonal complex, and respective lineages. Central STs: Light Green = founding group, Brown = founding subgroup; Light blue: common central ST. The samples, circled in red, are those included in this study.

The clonal complexes CC182 (n = 5; 23,80%) and CC309 (n = 3; 14,28%) were the most frequent. The distribution of CC, in relation to the sample origin, shows that three CCs with a predominance of CC182 (66,66%) in animals. In humans, nine CCs with a predominance of CC309 (15,38%), CC40 (15,38%), CC20 (15,38%), and CC306 (15,38%) were observed. In the environment, only two CCs were observed (Figure 2). CC182 and CC309 have been reported previously in Brazil; however, the CC associated with ST40 was the most frequent, as reported by Souto et al [25]. In addition, these same authors affirmed that the Brazilian isolates do not show a population structure established in accordance with the geographic region, indicating that Brazilian regions are dominated by different genotypes.

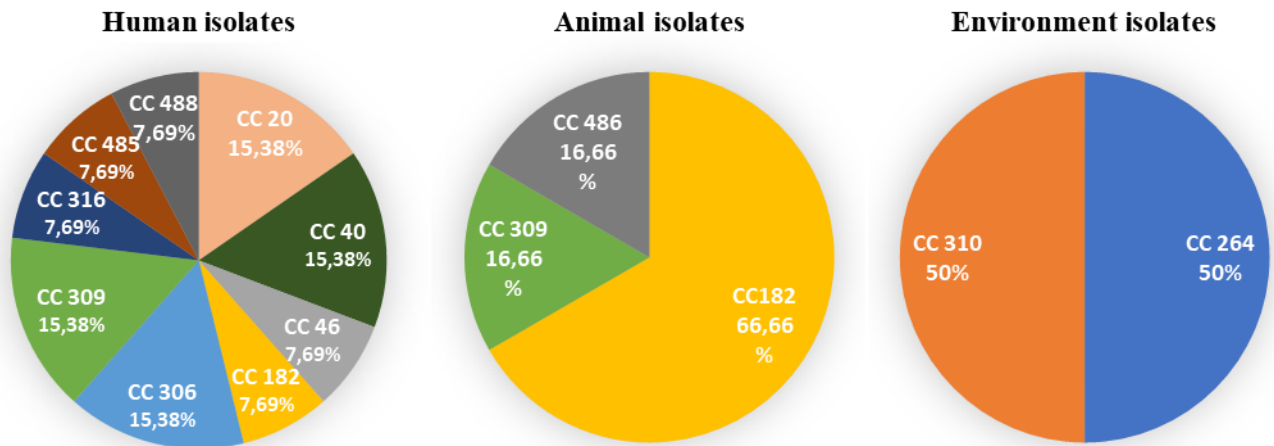


Fig 2 - Percentage distribution of the isolates of *C. gattii* VGII in relation to their origin and Clonal Complex (CC) in the State of Mato Grosso during the period from 2010 to 2017.

CC182 was isolated in four distinct species (human, feline, canine, and guinea pig) and is related to ST181 and the new ST489. One study reported that guinea pigs were naturally infected by genus *Cryptococcus* [29]. However, the molecular identification of genus *Cryptococcus* and its genotyping has not been described yet to complete the characterization process.

The occurrence of CC182 in tropical and temperate countries has been described by several authors in China, Caribbean Islands, and Guyana [15]. Moreover, according to Souto et al [25], this worldwide distribution proves the proximity between many Brazilian STs and the STs present globally, demonstrating the capacity for expansion, recombination, and adaptation of these strains.

CC309 was isolated from two humans and one cat (ST309) and, had already been described in São Paulo [30]. This ST belongs to the same lineage as that of the new ST488, which was isolated from humans and is associated with a new allele for the *SOD1* gene.

The clonal complex formed by the founder ST20 is considered hypervirulent and has already been described in North America (related to the outbreak at Vancouver Island), Europe and South America, the Amazon region, and the Southeast region of Brazil (São Paulo state) [2,25,30,31,32]. In addition, it has been modified and expanded to several other regions, based on the appearance of new strains. Adaptation and/or microevolution in the environment may be associated with the high frequency of this complex in the north of Brazil

[25] and, the isolation of ST20 may be related to human migration or the proximity of the center-west to the northern region (Amazonica).

In relation to the CC formed by the founder ST40, this has already been described in Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, and Mato Grosso do Sul [25,30,33], demonstrating the capacity for dispersion. Owing to potential genetic recombination, this complex has also been shown to be associated with the new lineage, ST487.

There was no defined founder in the group formed by ST46 and ST346; however, ST46 was already described in Norte de Santander (Colombia) [34] and in Amazonas (Brazil) [35]. ST316, described in humans [30] is related with ST135, which was isolated in the state of Mato Grosso do Sul (Brazil) [25]. Further, the new ST485 is in the same lineage as ST172, which was isolated from humans in Brasília (Brazil) [36].

The singleton isolates ST264, ST306, ST310, and ST486 were not correlated with any other genotype in the MLST database. However, in São Paulo, Brazil, ST264, ST306, and ST310 had already been reported in humans [30]. In addition, ST264 was also isolated from environmental samples in Amazonas [32], as reported herein. A new allelic profile and singleton were discovered in this study, represented by ST486.

Similar to the study by Souto et al [25], wide genetic diversity can generate highly virulent strains, either by factors such as changes in species composition, stress, climate change, or habitat, adaptation to regions of dry and humid climate, and variations in temperature. Thus, the State of Mato Grosso, comprising three biomes, Amazon, Cerrado, and Pantanal [37], may influence the clonal dispersion and/or recombination among the genotypes. Thus, the pathogenicity of the *C. gattii* species complex is probably related to its genetic diversity, global dispersion of isolates, and adaptation to different hosts [36].

4. CONCLUSION

Considerable genetic diversity of the *C. gattii* species complex was observed along with the appearance of news STs in MT. The higher frequency of CC309 and CC182 isolates, affecting both humans and animals, differed in the state of Mato Grosso from that in other regions studies, probably owing to the presence of different biomes in the region, which favor high genetic variability among isolates of the *C. gattii* species complex. This characteristic of the pathogen is a challenge for public health owing to the effect of this

dispersion, virulence, and resistance on treatment. In addition, higher detection of neurological cases in humans than in animals leads us to question the route of infection and the mechanism of action of this pathogen in the organisms of each species, thus indicating the need for further studies on the virulence of this complex.

5. ETHICAL APPROVAL

This study was certificated of the Animal and Human Ethics Committee No. 888 / CEP-HUJM / 2012.

6. CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

There are no conflicts of interest to declare

REFERENCES

- [1] R. Rajasingham, R.M. Smith, B.J. Park, J.N. Jarvis, N.P. Govender, T.M. Chiller, *et al.* **Global burden of disease of HIB-associated cryptococcal meningitis: na updated analysis.** *Lancet Infectious Disease*, 17 (2017), pp. 873-81. doi: 10.1016/S1473-3099.
- [2] L.M. Singer, W. Meyer, C. Firacative, G.R. Thompson, E. Samitz, J.E. Sykes. **Antifungal drug susceptibility and phylogenetic diversity among *Cryptococcus* isolates from dogs and cats in North America.** *Journal of clinical microbiology*, 52 (2014), pp. 2061-2070. doi:10.1128/JCM.03392-13.
- [3] F. Hagen, K. Khayhan, B. Theelen, A. Kolecka, I. Polacheck, E. Sionov, *et al.* **Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex.** *Fungal Genetics and Biology*, 78 (2015), pp.16-48. doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.009.
- [4] K.J. Kwon-Chung, J.E. Bennett, B.L Wickes, W. Meyer, C.A. Cuomo, K.R. Wollenburg, T.A. Bicanic, *et al.* **The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis.** *mSphere*, 2 (2017), p. e00357-16. doi: 10.1128/mSphere.00357-16.

- [5] J. Harris, S. Lockhart, Chiller, T. ***Cryptococcus gattii*: where do we go from here?** Medical Mycology, 50 (2012), pp.113-129. doi: 10.3109/13693786.2011.607854.
- [6] K.J. Kwon-Chung, J.A. Fraser, T.L. Doering, Z.A. Wang, G. Janbon, A. Idnurm, *et al.* ***Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 4 (2014), pp.1-27. doi: 10.1101/cshperspect.a019760.
- [7] C. Stephen, S. Lester, W. Black, M. Fyfe, S. Raverty **Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia.** Canadian Veterinary Journal, 43 (2002), pp.792–794.
- [8] A. Espinel-Ingroff, S.E. Kidd. **Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada.** Infection and Drug Resistance, 8 (2015), pp.89-97. doi: 10.2147/IDR.S57686
- [9] A.B. Shields, L. Ajello. **Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*.** Science, 151 (1966), pp.208-209.
- [10] M. Del Poeta, D.N. Toffaletti, T.H. Rude, C.C. Dykstra, J. Heitamn, J.R. Perfec. **Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target.** Genetics Society of America, 152 (1999), pp. 167-178.
- [11] F.H. Aoki, T. Imai, R. Tanaka, Y. Mikami, H. Taguchi, N.F. Nishimura, *et al.* **New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses.** Journal of Clinical Microbiology, 37 (1999), pp. 315-320.
- [12] C. D’Souza, F. Hagen, T. Boekhout, G.M. Cox, J. Heitman. **Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals.** Current Genetics, 46 (2004), pp.92-102. doi: 10.1007/s00294-004-0511-y.
- [13] W. Meyer, A. Castañeda, S. Jackso, M. Huynh, E. Castañeda, I.C.S. Group. **Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates.** Emerging Infectious Diseases, 9 (2003) pp.189-195. doi: 10.3201/eid0902.020246.
- [14] W. Meyer, D.M. Aanensen, T. Boekhout, M. Cogliati, M.R. Diaz, M.C. Esposto *et al* **Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*.** Medical Mycology, 47 (2009), pp.561-570. doi:10.1080/13693780902953886.

- [15] H.T. Dou, Y.C. Xu, H.Z. Wang, T.S. Li. **Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 34 (2015), pp. 753-763. doi: 10.1007/s10096-014-2289-2.
- [16] S.C. Chen, W. Meyer, T.C. Sorrell. ***Cryptococcus gattii* infections.** Clinical Microbiology Reviews, 27 (2014), pp.980-1024. doi: 10.1128/CMR.00126-13.
- [17] D.J. Springer, V. Chatuverdi. **Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*.** Emerging Infectious Diseases, 16 (2010), pp.14-20. doi: 10.3201/eid1601.090369.
- [18] F. Hagen, P.C. Ceresini, I. Polacheck, H. Ma, F.V. Nieuwerburgh, T. Gabaldón *et al.* **Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest.** PLoS ONE, 8 (2013), p.e71148. doi:10.1371/journal.pone.0071148.
- [19] S.E. Kidd, F. Hagen, R.L. Tschärke, M. Huynh, K.H. Bartlett, M. Fyfe, *et al.* **A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada).** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101 (2004), pp.17258–17263. doi:10.1073/pnas.0402981101.
- [20] X. Feng, Z. Yao, D. Ren, W. Liao, J. Wu. **Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients.** FEMS Yeast Research, 8 (2008), p.930-938. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00422.x.
- [21] P. Ngamskulrungrroj, F. Gilgado, J. Faganello, A.P. Litvintseva, A.L. Leal, K.M. Tsui. **Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties.** PLoS ONE, 4 (2009), p.e5862. doi:10.1371/journal.pone.0005862.
- [22] L. Trilles, M.S. Lázera, B. Wanke, R.V. Oliveira, G.G. Barbosa, M.M. Nishikawa *et al.* **Regional pattern of the molecular types of *C. neoformans* and *C. gattii* in Brazil.** Memória Instituto Oswaldo Cruz, 103 (2008), pp. 455-462.
- [23] A.K. Casali, L. Goulart, L.K.R. Silva, A.M. Ribeiro, A.A. Amaral, S.H. Alves *et al.* **Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul.** FEMS Yeast Research, 3 (2003), pp.405-415. doi: 10.1016/S1567-1356(03)00038-2.



- [24] D.A.J. Paula, A.B.P.F Almeida, F.S. Cruz, F.H. Furlan, E.M. Colodel, V.R.F. Sousa *et al.* **Occurrence and molecular characterization of cryptococcosis in dogs and cats in Mato Grosso, Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34 (2014), pp.167-172.
- [25] A.C.P. Souto, L.X. Bonfietti, K. Ferreira-Paim, L. Trilles, M. Martins, M. Ribeiro-Alves *et al.* **Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the amazon rainforest to the semi-arid desert in the northeast of Brazil.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10 (2016), pp.1-19. doi:10.1371/journal.pntd.0004885.
- [26] E.C. Silva, J.M. Guerra, L.N. Torres, A.M.D. Lacerda, R.G. Gomes, D.M. Rodrigues, *et al.* ***Cryptococcus gattii* molecular type VGII infection associated with lung disease in a goat.** *BMC Veterinary Research*, 13 (2017), pp.1-6. doi:10.1186/s12917-017-0950-6.
- [27] V.A. Barcellos, L.M.S. Martins, A.C.L. Fontes, J.C.V. Rewsaat, W.D. Squizani, G.R.S. Araújo *et al.* **Genotypic and Phenotypic Diversity of *Cryptococcus gattii* VGII Clinical Isolates and Its Impact on Virulence.** *Frontiers in Microbiology*, 9 (2018), p.132. doi: 10.3389/fmicb.2018.00132.
- [28] S.R. Lockhart, N. Iqbal, J.R. Harris, N.T. Grossman, E. Debess, R. Wohrle *et al.* ***Cryptococcus gattii* in the United States: genotypic diversity of human and veterinary isolates.** *PLoS ONE*, 8 (2013), p.e74737. doi: 10.1371/journal.pone.0074737.
- [29] H.V. Herck, T.S.G.A.M.V.D. Ingh, M.H.V.D. Hage, P. Zwart. **Dermal cryptococcosis in a guineapig.** *Laboratory Animals*, 22 (1988), p.88-91.
- [30] L.X. Bonfietti, C.D. Pham, M.W. Szeszs, D.C. Silva, M.A. Martins, S.R. Lockhart *et al.* **Diversidade de isolados clínicos de *Cryptococcus gattii* por *Multi-locus sequence typing* no Estado de São Paulo.** *Boletim do Instituto Adolfo Lutz*, 24 (2014), pp.36-39.
- [31] F. Carriconde, F. Gilgado, I. Arthur, D. Ellis, R. Malik, N.V. Wiele *et al.* **Clonality and a-a Recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population - an emerging outbreak in Australia.** *PLoS ONE*, 6 (2011), p.e16936. doi:10.1371/journal.pone.0016936.
- [32] F. Brito-Santos, G.G. Barbosa, L. Trilles, M.M. Nishikawa, B. Wanke, W. Meyer *et al.* **Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin.** *PLoS ONE*, 10 (2015), p.e0115866. doi:10.1371/journal.pone.0115866.

- [33] D.M. Engelthaler, N.D. Hicks, J.D. Gillece, C.C. Roe, J.M. Schupp, E.M. Driebe *et al.* ***Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal.** MBio, 5 (2014), p.e0146414. doi:10.1128/mBio.01464-14.
- [34] J. Lizazaro, P. Escandón, C.I. Agudelo, C. Firacative, W. Meyer, E. Castañeda. **Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997-2011.** PLoS Neglected Tropical Disease, 8 (2014), p.e3272. doi:10.1371/journal.pntd.0003272.
- [35] G.S.B. Alves, A.K.L. Freire, A.S. Bentes, J.F.S. Pinheiro, J.V.B. Souza, B. Wanke. **Original article molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil.** Mycoses, 59 (2016), pp.509-515. doi:10.1111/myc.12499.
- [36] F. Hagen, M.F. Colom, D. Swinne, K. Tintelnot, R. Iatta, M.T. Montagna, *et al.* **Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe.** Emerging Infectious Diseases, 18 (2012), pp.1618-1624. doi: 10.3201/eid1810.120068.
- [37] IBGE. **Mapas de biomas do Brasil: escala 1:5.000.000.** 2017. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm>>. Acesso em 02 maio 2017.



Letter to the editor

Molecular detection of *Mycobacterium leprae* by Polymerase Chain Reaction in captive and free-ranging wild animals

Fernanda H. Maruyama, Thais O. Morgado, Richard C. Pacheco, Luciano Nakazato, Valeria Dutra   [Show more](#)<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.09.003>[Get rights and content](#)Under a [Creative Commons license](#)

Dear Editor:

Leprosy, a disease neglected in many countries, is endemic in Brazil. With a wide diversity of fauna distributed in three biomes (Amazon Forest, Cerrado and Pantanal), the state of Mato Grosso (MT) in the Central-West Region has the highest prevalence of human cases: 7.75 per 10,000 inhabitants (1). Despite the scarcity of data in the literature on wild animals naturally infected with *Mycobacterium leprae*, the possibility of transmission to humans cannot be ruled out. Armadillos, red squirrels, and non-human primates are important natural reservoirs of *M. leprae* in the literature, becoming possible sources of bacillary dissemination. Thus, they make it difficult to interrupt the leprosy transmission chain (2). Data on natural infections are scarce, making it difficult to understand the role of wild animals in transmission of the disease. Therefore, we used PCR to detect the genetic material of *M. leprae* in nasal swabs of wild animals.

Nasal swabs were collected from 69 captive and free wild animals from the MT and Pantanal regions of Brazil, independent of the clinical signs, and sent to the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, according to “Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (SISBIO), an authorization and information system for biodiversity (n° 40617-1 and 42303). The samples were submitted for extraction of genetic material

according to the phenol/chloroform method. PCR was performed according Woods and Cole (3). The PCR product was purified using a GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and sequenced using an ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation, USA). The sequences were deposited in GenBank and compared using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Of the 69 samples (Table 1), 6 (8.69%) wild-type free and captive animals tested positive for *M. leprae* by PCR, including 1 margay (*Leopardus wiedii*), 2 lowland tapirs (*Tapirus terrestris*), 2 capuchin monkeys (*Sapajus apella*), and 1 owl monkey (*Aotus trivirgatus*). The detection in four different species of wild animals shows the ability of this bacillus to be carried in different hosts. In addition, two animals were from the zoo, that could acquire *M. leprae* due to close contact to humans or environmental contamination. However, in literature the mechanism of transmission is not yet fully understood (4).

Knowledge of the environment surrounding the infected humans or animals, and the route of infection and the mode of transmission are necessary to understand endemics in certain regions (4). Truman et al. (5) described that isolates from human and armadillos are identical genetically. Thus, we suggest that the possible contact of animals of this study, which may be possible carriers of the bacillus, with other animals or with humans can disseminate the disease, due the possibility to detect the bacillus in nasal swabs. Thus, we observe that the detection in wild animals may be associated with high prevalence and endemicity in the state of MT, which makes them important sources of infection. In addition, these data contribute to a better understanding of the epidemiology of leprosy.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES for financial support through a scholarship.

Disclaimers

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliate

References

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2016.
2. Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016 Nov 11; 354:744-747.
3. Woods SA, Cole ST. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. *Molecular Microbiology*. 1990;4(10):1745-1751.
4. Turankar RP, Lavania M, Singh M, Sengupta U, Sai KSRS, Jadhav RS. Presence of viable *Mycobacterium leprae* in environmental specimens around houses of leprosy patients. *Indian J Med Microbiol*. 2016;34:315-321.
5. Truman RW, Pushendra S, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A et al. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. *The N Engl J Med*. 2011; 364: 1626-1633.

Table 1 – Epidemiological data and *M. leprae* PCR test of the animals identified in Mato Grosso – Brazil.

| ID | Free-ranging | City | Species | Scientific name | PCR |
|----------|--------------|---------------------------|---------------------|----------------------------------|----------|
| m962/16 | Yes | Jangada | Jaguarundi | <i>Puma yagouaroundi</i> | Negative |
| m1016/16 | Yes | Marcelândia | Jaguar | <i>Panthera onca</i> | Negative |
| m1102/16 | No | Zoo ^a | Cougar | <i>Puma concolor</i> | Negative |
| m1122/16 | No | Zoo | Coati | <i>Nasua nasua</i> | Negative |
| m1162/16 | Yes | Cuiabá | Guinea pig | <i>Cavia porcellus</i> | Negative |
| m1226/16 | Yes | Barra do Bugres | Ocelot | <i>Leopardus pardalis</i> | Negative |
| m1285/16 | Yes | NA ^b | Jaguarundi | <i>Puma yagouaroundi</i> | Negative |
| m1294/16 | Yes | Várzea Grande | Capybara | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Negative |
| m1335/16 | No | Zoo | Giant anteater | <i>Myrmecophaga tridactyla</i> | Negative |
| m1336/16 | Yes | Rosário Oeste | Giant anteater | <i>Myrmecophaga tridactyla</i> | Negative |
| m1364/16 | Yes | Cuiabá | Collared anteaters | <i>Myrmecophaga tetradactyla</i> | Negative |
| m1485/16 | Yes | Santo Antônio do Leverger | Otter | <i>Lontra longicaudis</i> | Negative |
| m1491/16 | Yes | NA | White-eared opossum | <i>Didelphis albiventris</i> | Negative |

– Table 1 (Continued)

| ID | Free-ranging | City | Species | Scientific name | PCR |
|----------|--------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| m1529/16 | No | Zoo | Agouti | <i>Dasyprocta Aguti</i> | Negative |
| m1787/17 | Yes | NA | Owl monkey | <i>Aotus trivirgatus</i> | Positive Genbank MF975704 |
| m1790/16 | Yes | Tangará da Serra | Giant anteater | <i>Myrmecophaga tridactyla</i> | Negative |
| m1795/16 | No | Zoo | Coati | <i>Nasua nasua</i> | Negative |
| m1796/16 | No | Zoo | Agouti | <i>Dasyprocta aguti</i> | Negative |
| m1862/16 | Yes | Várzea Grande | Collared anteaters | <i>Myrmecophaga tetradactyla</i> | Negative |
| m11/17 | Yes | Cuiabá | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Positive Genbank MF975703 |
| m74/17 | No | Zoo | Cougar | <i>Puma concolor</i> | Negative |
| m153/17 | Yes | Cuiabá | White-eared opossum | <i>Didelphis albiventris</i> | Negative |
| m234/17 | No | Zoo | Cougar | <i>Puma concolor</i> | Negative |
| m235/17 | Yes | Cuiabá | Sagui | <i>Callithrix sp.</i> | Negative |
| m248/17 | No | Zoo | Maned wolf | <i>Chrysocyon brachyurus</i> | Negative |
| m261/17 | Yes | NA | Black owler monkey | <i>Alouatta caraya</i> | Negative |
| m305/17 | No | Zoo | Lowland tapirs | <i>Tapirus terrestris</i> | Positive Genbank MF975707 |
| m345/17 | No | Zoo | Cougar | <i>Puma concolor</i> | Negative |
| m379/17 | Yes | NA | Black-tufted marmoset | <i>Callithrix penicillata</i> | Negative |
| m514/17 | No | Zoo | White-cheeked spider monkey | <i>Ateles marginatus</i> | Negative |
| m520/17 | No | Zoo | White-cheeked spider monkey | <i>Ateles marginatus</i> | Negative |
| m530/17 | Yes | NA | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Positive Genbank MF818035 |
| m539/17 | Yes | NA | Monkey | NA | Negative |
| m542/17 | Yes | Santo Antônio do Leverger | Owl monkey | <i>Aotus sp.</i> | Negative |
| m543/17 | Yes | Santo Antônio do Leverger | Owl monkey | <i>Aotus sp.</i> | Negative |
| m705/17 | Yes | Cuiabá | Monkey | NA | Negative |
| m709/17 | Yes | Poconé | Giant anteater | <i>Myrmecophaga tridactyla</i> | Negative |
| m743/17 | No | Zoo | Coati | <i>Nasua nasua</i> | Negative |
| m748/17 | Yes | Poconé | Crab-eating fox | <i>Cerdocyon thous</i> | Negative |
| m765/17 | No | Zoo | Ocelot | <i>Leopardus pardalis</i> | Negative |
| m787/17 | No | Zoo | Margay | <i>Leopardus weidii</i> | Positive Genbank MF975706 |
| m809/17 | Yes | Rondonópolis | Lowland tapirs | <i>Tapirus terrestris</i> | Positive Genbank MF975705 |
| m874/17 | No | Zoo | Coati | <i>Nasua nasua</i> | Negative |
| m878/17 | Yes | Campo Verde | Howler monkey | <i>Alouatta sp.</i> | Negative |
| m879/17 | No | Zoo | Crab-eating fox | <i>Cerdocyon thous</i> | Negative |
| m742/17 | No | Zoo | Coati | <i>Nasua nasua</i> | Negative |
| m721/17 | No | Zoo | Coati | <i>Nasua nasua</i> | Negative |
| m871/17 | Yes | Cuiabá | Owl monkey | <i>Aotus azare</i> | Negative |
| m897/17 | No | Zoo | Crab-eating fox | <i>Cerdocyon thous</i> | Negative |
| m881/17 | No | Zoo | Crab-eating fox | <i>Cerdocyon thous</i> | Negative |
| m1055/17 | Yes | NA | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Negative |
| m1070/17 | Yes | NA | Capybara | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Negative |
| m1126/17 | Yes | Tangará da Serra | Cougar | <i>Puma concolor</i> | Negative |
| m1153/17 | No | Zoo | Crab-eating fox | <i>Cerdocyon thous</i> | Negative |
| m1247/17 | Yes | NA | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Negative |
| m1153/17 | No | Zoo | Crab-eating fox | <i>Cerdocyon thous</i> | Negative |
| m1247/17 | Yes | NA | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Negative |
| m1248/17 | Yes | NA | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Negative |
| m1249/17 | Yes | NA | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Negative |
| m1267/17 | Yes | Poconé | Capybara | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Negative |
| m1268/17 | Yes | Poconé | Capybara | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Negative |
| m1269/17 | Yes | Poconé | Capybara | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Negative |
| m1270/17 | Yes | Poconé | Capybara | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Negative |
| m1271/17 | Yes | Poconé | Capybara | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Negative |
| m1272/17 | Yes | Poconé | Capybara | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> | Negative |
| m1290/17 | Yes | Cuiabá | Owl monkey | <i>Aotus nigriceps</i> | Negative |
| m1309/17 | Yes | Cáceres | Cougar | <i>Puma concolor</i> | Negative |
| m1313/17 | Yes | Cuiabá | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Negative |
| m1327/17 | Yes | NA | Black owler monkey | <i>Alouatta caraya</i> | Negative |
| m1338/17 | Yes | Cuiabá | Capuchin monkey | <i>Sapajus apella</i> | Negative |
| m1339/17 | Yes | Cuiabá | Sagui | <i>Callithrix sp.</i> | Negative |

* Federal University of Mato Grosso-Cuiabá.

^b NA, not available.

5 CONCLUSÕES

5.1 Diversidade genética do complexo de espécies de *Cryptococcus gattii* no Estado de Mato Grosso, Brasil.

- Observou-se uma alta diversidade genética do complexo de espécies *C. gattii* no estado de MT, evidenciado pelos aparecimentos de novos STs.
- CC309 e CC182 tiveram maior frequência, afetando humanos e animais, o que diverge o estado de Mato Grosso de outras regiões brasileiras.
- O conhecimento do complexo de espécies *C. gattii* ainda é um desafio para a saúde pública devido ao efeito dessa dispersão, virulência e resistência ao tratamento.
- Casos de maior detecção neurológica em humanos do que em animais ainda é um desafio no estudo do complexo de espécies *C. gattii*, indicando a necessidade de mais pesquisas sobre a virulência dessa levedura.

5.2 Detecção molecular de *Mycobacterium leprae* pela técnica de reação pela cadeia em polimerase, em animais silvestres de vida livre e cativoiro.

- O possível contato dos animais deste estudo, que podem ser possíveis portadores do bacilo, com outros animais ou com humanos, pode disseminar a doença, pela possibilidade de detectar o bacilo em swabs nasais.
- Animais silvestres podem estar associados a alta prevalência e endemicidade no estado de MT, o que os torna importantes fontes de infecção.
- Este estudo contribui para um melhor entendimento da epidemiologia da hanseníase.