

3. Mommers M, Weishoff-Houben M, Swaen GM, Creemers H, Freund H, Dott W, van Schayck CP: Infant immunization and the occurrence of atopic disease in Dutch and German children: a nested case-control study. *Pediatr Pulmonol* 2004;38:329-34.
4. Laubereau B, Grote V, Holscher G, Holscher B, Frye C, Wichmann HE, Heinrich J: Vaccination against Haemophilus influenzae type B and atopy in east German schoolchildren. *Eur J Med Res* 2002;7:387-92.
5. DeStefano F, Gu D, Kramarz P, Truman BI, Iademarco MF, Mullooly JP, Jackson LA, Davis RL, Black SB, Shinefield HR, Marcy SM, Ward JI, Chen RT: Vaccine Safety Datalink Research Group. Childhood vaccinations and risk of asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:498-504.
6. Conyn-Van Spaendonck MA, de Melker HE, Abbink F, Elzinga-Gholizadea N, Kimman TG, van Loon T. Immunity to poliomyelitis in The Netherlands. *Am J Epidemiol* 2001;153:207-14.
7. Asher MI, Keil U, Anderson HR et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* 1995;8:483-91.
8. Anyo G, Brunekreef B, de Meer G, Aarts F, Janssen NA, van Vliet P. Early, current and past pet ownership: associations with sensitization, bronchial responsiveness and allergic symptoms in school children. *Clin Exp Allergy* 2002;32:361-6.
9. Rothman K. *Modern Epidemiology*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1998: 256-7.
10. Van de Ven MO, van den Eijnden JJ, Engels RC. Prevalentie van astma, hooikoorts en eczeem bij Nederlandse vroeg-adolescenten. *TSG* 2005;83: 135-44.



## Epidemiologische trends in cryptokokkose

### De *Cryptococcus gattii*-uitbraak in Canada

F. Hagen en T. Boekhout<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centraal Bureau voor Schimmelmicrocultures, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, e-mail: boekhout@cbs.knaw.nl.

**C**ryptokokkose is, indien onbehandeld, een fatale ziekte die in Nederland hoofdzakelijk veroorzaakt wordt door de gist *Cryptococcus neoformans* en soms door *Cryptococcus gattii*. Een belangrijk verschil tussen beide soorten is dat *C. gattii* voornamelijk immunocompetente individuen infecteert, terwijl *C. neoformans* een voorkeur heeft voor immunodeficiënte personen. Daarnaast wordt *C. gattii* hoofdzakelijk aangetroffen in tropische en subtropische regio's, terwijl *C. neoformans* wereldwijd voorkomt. Het verspreidingspatroon van *C. gattii* is recentelijk echter ingrijpend gewijzigd door een uitbraak op Vancouver Island (British Columbia, Canada) waar een gematigd zeeklimaat heerst. Epidemiologisch onderzoek heeft aangetoond dat deze cryptokokkose-uitbraak werd veroorzaakt door een zeldzaam genotype van *C. gattii*. Voor deze uitbraak waren hiervan slechts enkele isolaten bekend. Echter, gedurende het afgelopen decennium worden stammen van dit genotype frequenter geïsoleerd, vooral in Zuid-Amerika. Het aantal *C. neoformans*-infecties in Nederland in HIV/Aidspatiënten vertoont een dalende trend, mede door de introductie van de HAART-therapie. Maar artsen en microbiologen dienen nu ook alert te zijn op infecties met *C. gattii* bij (immunocompetente) personen die recentelijk Vancouver Island en het vaste land van British Columbia (Canada) hebben bezocht.

Cryptokokkose is de meest voorkomende levensbedreigende systemische schimmelinfectie bij HIV-geïnfecteerde mensen.<sup>7,24</sup> De meest voorkomende klinische manifestatie, gedissemineerde meningo-encefalitis, kent een fatale afloop indien behandeling met antimycotica achterwege blijft. Schattingen van UNAIDS/WHO laten zien dat in Afrika, voornamelijk ten zuiden van de Sahara (www.who.int/hiv/; data 2002), meer dan 28 miljoen men-

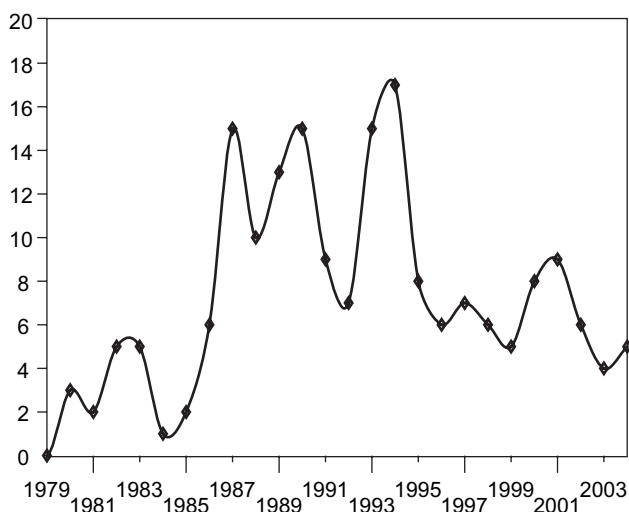
sen met het Humaan Immunodeficiëntie Virus (HIV) zijn geïnfecteerd. Infectie met *C. neoformans* vormt voor deze HIV-geïnfecteerde populatie een aanzienlijk gezondheidsrisico. Tussen 1989 en 1998 is in Zuid-Afrika de incidentie van cryptokokkose verzesvoudigd, en in verreweg de meeste gevallen betreft het hier HIV-geïnfecteerden.<sup>20</sup> In de provincie Gauteng (Zuid-Afrika, 9 miljoen inwoners) bedraagt de incidentie van *Cryptococcus*-infecties 13,8 per

100.000 inwoners, 18 per 100.000 inwoners boven de 15 jaar oud, en maar liefst 3.117 per 100.000 HIV-geïnfecteerde inwoners. Deze laatste categorie betreft voornamelijk (98%) jonge, zwarte Zuid-Afrikanen,<sup>20</sup> waarmee cryptokokkose in Afrika kan worden opgevat als een armoedege-relateerde infectieziekte, waarvoor, helaas, vanuit de politiek weinig belangstelling bestaat. Cynisch is dat behandeling goed mogelijk is, maar wegens financieel-economische ontwikkelingen en gebrek aan politieke wil achterwege blijft.

dit is de eerste uitbraak waarbij zowel  
mensen en dieren op grote schaal werden  
geïnfecteerd

### Cryptokokkose in Nederland

In het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam wordt een collectie van *C. neoformans*-isolaten bewaard afkomstig van diverse Nederlandse klinische centra, die een periode bestrijkt van 1977 tot heden. In totaal zijn 193 isolaten getypeerd. De meeste isolaten waren afkomstig uit hersenvocht (77%), en in mindere mate uit bloed (15%) en overig lichaamsmateriaal (8%), zoals long- en botweefsel. De incidentie van cryptokokkose vertoonde een duidelijke stijging met de opmars van het HIV-virus in het begin van de jaren tachtig van de vorige eeuw, maar na de introductie van de HAART-therapie is een duidelijke afname van het aantal *Cryptococcus*-infecties zichtbaar (figuur 1).<sup>25</sup> De grote meer-

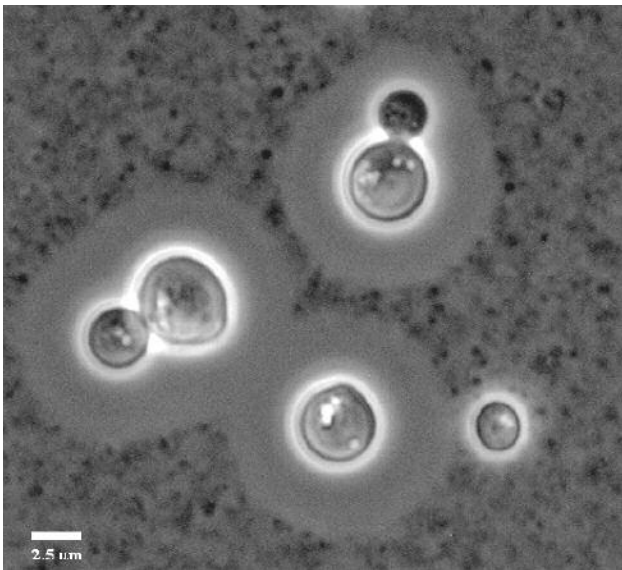


**Figuur 1.** De ontwikkeling van cryptokokkose in Nederland gedurende de periode 1979 tot 2004. Het grootste aantal isolaten ( $n = 99$ ) was afkomstig van HIV-geïnfecteerden, 35 isolaten waren afkomstig uit immuungecompromitteerde patiënten, 17 van immunocompetente patiënten en 42 hadden een onbekende klinische herkomst.

derheid van isolaten ( $n = 153$ ) was afkomstig van mannen en 39 van vrouwen. De incidentie van cryptokokkose varieerde bij vrouwen gedurende de onderzochte periode tussen 0 en 4 gevallen per jaar, met een gemiddelde van 1,56 per jaar. Bij mannen vertoonde de incidentie een sterke stijging tot 16 gevallen per jaar in 1994, met een gemiddelde van 6,1 per jaar. De hoogste aantallen kwamen voor in Amsterdam ( $n = 77$ ), Nijmegen ( $n = 12$ ), Rotterdam ( $n = 9$ ) en Utrecht ( $n = 13$ ).

*Cryptococcus neoformans* en *C. gattii* zijn facultatieve mens- en dierpathogene gisten met een kapsel (zie figuur 2). Isolaten van *C. neoformans* kunnen worden geïsoleerd uit een grote verscheidenheid aan habitats, zoals vogeluitwerpselen en guano (meststof bestaande uit de verdroogde mest en overblijfselen van zeevogels, die op onbewoonde eilanden en klippen in de loop der eeuwen tot dikke lagen is opeengehoopt), insecten, bomen, lucht en gefermenteerde vruchtensappen.<sup>5,13</sup> Waarschijnlijk is de primaire ecologische niche van de soort gerelateerd aan bomen,<sup>8,17</sup> hoewel dat in Europa nog niet is vastgesteld. Hier is vooral het voorkomen van de gist in vogeluitwerpselen belangrijk, omdat deze een bron van besmetting kunnen zijn.<sup>13,16,22</sup>

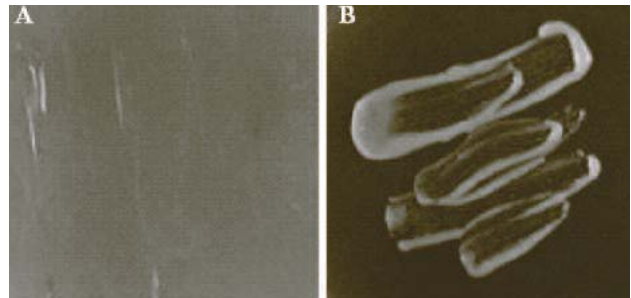
Gedurende de laatste jaren is duidelijk geworden dat *C. neoformans* in feite een soortencomplex betreft, waarvan de verschillende varianten behoren tot verschillende soorten, genotypen en serotypen. Door middel van DNA-fingerprinting met behulp van PCR en AFLP ('Amplified fragment length polymorphism')-analyse van een wereldwijd verzamelde collectie van isolaten is aangetoond dat er tenminste 10 genotypen in het complex voorkomen.<sup>1,3,4,21</sup> Een aantal van deze genotypen verschilt ook in klinische manifestatie. Genotypering en sequentieanalyse van een aantal genen en het ribosomale DNA hebben ertoe geleid dat *C. neoformans* var. *gattii* nu als een aparte soort, *C. gattii*, wordt opgevat.<sup>3,14</sup> Mogelijk behoren ook de serotype D (= *C. neoformans* var. *neoformans*) en de serotype A-stammen (= *C. neoformans* var. *grubii*) tot aparte soorten. Een extra bijzonderheid is het voorkomen van hybriden tussen serotype A- en D- isolaten, de zogenaamde AD-hybriden, die klinisch vooral in Zuid-Europa van belang zijn.<sup>6</sup> Dergelijke hybriden komen ook voor tussen *C. gattii* en *C. neoformans*.<sup>4</sup> Een belangrijke ontwikkeling is dat het genoom van 2 serotype D-stammen is opgehelderd,<sup>18</sup> en dat er momenteel wordt gewerkt aan de genomanalyse van een serotype A-stam en van enkele varianten van *C. gattii*. Tevens worden methoden ontwikkeld om de virulentie en genoomvariatie te onderzoeken.



**Figuur 2.** Microscopische opname van *Cryptococcus gattii* (CBS 883) cellen, negatief gekleurd met behulp van Oost-Indische inkt waardoor het extracellulaire kapsel duidelijk zichtbaar is.

### Vancouver Island uitbraak

Sinds 1999 is de incidentie van cryptokokkose op Vancouver Island, gelegen voor de westkust van Canada (zie kaart), sterk gestegen van 8,5 tot 37 gevallen per miljoen inwoners per jaar.<sup>11,12</sup> Alle geïnfecteerde individuen waren immunocompetent en woonden op het eiland of hadden dit kort tevoren bezocht. In de meeste gevallen (72%) betrof het een infectie van de longen, en bij slechts 26% werd een aantasting van het centrale zenuwstelsel geconstateerd. De patiënten varieerden in leeftijd van 11 tot 87 jaar, met een gemiddelde van bijna 60 jaar<sup>12</sup> met een incubatietijd tussen de 61 en 328 dagen.<sup>19</sup> Achtenvijftig procent was mannelijk, en de meerderheid (bijna 95%) blank, de overige Aziatisch. Naast mensen werden ook grote aantallen (>200) geïnfecteerde dieren aangetroffen, waaronder katten, honden, fretten, maar ook dolfijnen. Deze laatste spoelden dood aan op stranden op, of in de buurt van Vancouver Island. Dit is de eerste uitbraak waarbij zowel mensen en dieren op grote schaal werden geïnfecteerd door cryptokokken. Opmerkelijk is dat vrijwel alle ziektegevallen van mensen en dieren zich voordeden op het Zuidoostelijk gelegen deel van het eiland en wel in een speciale ecologische zone, de zogenoemde 'Coastal Douglas Fir' (CDF) biogeoklimatologische zone. Uitgebreide bemonstering van de lucht, grond, maar ook directe bemonstering van diverse bomen die voorkomen in deze CDF-zone, waaronder de aardbezieboom (= *Arbutus* spp.), els, eik, ceder, Douglas spar, en andere soorten, heeft aangetoond dat de gist op grote schaal voorkomt op bomen. Ook kon de gist worden aangetoond in de bovenste 10 cm van de aarde en in de lucht nabij



**Figuur 3.** Canavanine-glycine-broomthymolblauw (CGB) medium is een gebruikelijke methode om *Cryptococcus neoformans* (A; negatief) te onderscheiden van *Cryptococcus gattii* (B; positief).<sup>15</sup> *C. gattii* is, in tegenstelling tot *C. neoformans*, resistent tegen L-canavanine en is daardoor in staat om glycine te assimileren waardoor de kleur van het medium omslaat van lichtgroen naar blauw. Verdere differentiatie in beide *Cryptococcus*-soorten is alleen mogelijk met serotypering en moleculaire technieken. (Deze foto's kunt u in kleur bekijken op onze website [www.infectieziektenbulletin.nl](http://www.infectieziektenbulletin.nl))

besmette bomen. De diepere grondlagen waren echter negatief. De bemonsterde *Eucalyptus*-bomen, een belangrijke bron van *C. gattii*-infectie in Australië, waren echter negatief.<sup>2</sup> Inmiddels is vastgesteld dat de gist zich ook op het Canadese vasteland heeft gevestigd en dus mogelijk zijn areaal uitgebreid (K. Bartlett, persoonlijke mededeling).

De voor de uitbraak verantwoordelijke gist werd met behulp van fenotypische (figuur 3) en moleculaire technieken geïdentificeerd als *Cryptococcus gattii*, die, zoals al vermeld (zie kader), vroeger werd geclassificeerd als een variëteit van *C. neoformans*. *C. gattii* was tot deze uitbraak vooral

### de gist kan na vestiging in Europa tot eenzelfde uitbraak leiden als in Canada

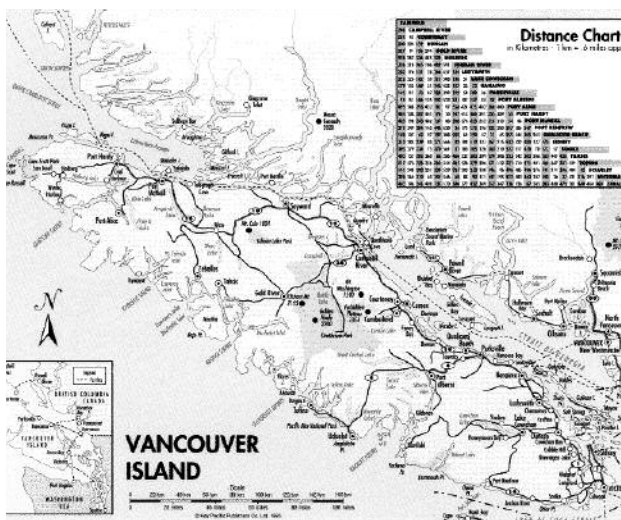
bekend van meer tropische gebieden, zoals grote delen van Zuid-Amerika, Azië, en Australië. Binnen *C. gattii* komen 4 genotypen voor en 1 hiervan, namelijk genotype VGII/AFLP6, bleek verantwoordelijk voor de uitbraak.<sup>3,12,21</sup> Dit genotype werd pas recentelijk onderscheiden en was tot voor kort bekend van een zeer beperkt aantal locaties in Uruguay, Aruba, Californië en Seattle in de staat Washington.<sup>3,21</sup> Dit laatste isolaat, afkomstig uit sputum van een patiënt, werd in het begin van de jaren 70 van de vorige eeuw geïsoleerd, en toont aan dat het zeer waarschijnlijk is dat het genotype VGII/AFLP6 toen al in de omgeving van Vancouver Island aanwezig was, zonder dat dit zich ontwikkelde tot een epidemische uitbraak. PCR-

fingerprinting en AFLP-analyse van uitbraakgerelateerde isolaten afkomstig van mensen, dieren en de natuurlijke omgeving, heeft aangetoond dat de genetische variatie binnen de populatie zeer beperkt is. Met PCR-fingerprinting konden 2 subtypen worden onderscheiden, terwijl AFLP 3 subtypen liet zien. Het overgrote deel behoorde echter tot één enkel type, namelijk genotype VGIIa of AFLP6A.<sup>12</sup> We weten inmiddels dat hetzelfde genotype VGII/AFLP6 ook infecties veroorzaakt in Colombia, Brazilië en delen van Azië en Australië.<sup>1,3,9,21,23</sup> Zeer recentelijk zijn enkele stammen van dit genotype opgedoken in Griekenland (A. Velegraki, F. Hagen & T. Boekhout, ongepubliceerde waarnemingen). Vermoedelijk bestaat er geen epidemiologisch verband tussen de Europese en Canadese isolaten. Wel is het opmerkelijk dat de 'tropische' gist *C. gattii* binnen een kort tijdsbestek opduikt in gebieden met een gematigd tot mediterraan klimaat. Het is niet uitgesloten dat de gist, na vestiging in Europa, tot eenzelfde uitbraak kan leiden als in Canada. Een recent voorbeeld is een geval van cryptokokkose bij een Deense toerist die tijdens een vakantie in Canada een week op Vancouver Island verbleef. De *Cryptococcus*-stam geïsoleerd uit deze patiënt, bleek geheel identiek te zijn aan het 'Vancouver Island AFLP6A'-genotype. Dit geeft aan hoe virulent *C. gattii*-isolaten van dit specifieke genotype kunnen zijn. Artsen en microbiologen dienen hierop alert te zijn.

Over de oorzaak van deze uitbraak bestaat nog veel onduidelijkheid. Vast staat dat de CDF-zone in het Zuidoosten van Vancouver Island een hoge dichtheid heeft van deels zeer kleine (< 1.1 µm) gistcellen, die tot diep in de longen kunnen penetreren en zo een infectie kunnen bewerkstelligen.<sup>12</sup> Waarschijnlijk zijn de infecties van mens en dier het gevolg van deze hoge dichtheid aan infectieuze cellen in de natuurlijke omgeving van Vancouver Island. Rest de vraag waarom deze dichtheid in het recente verleden zo kon toe-

nemen? Ook is nog onduidelijk hoe de uitbraak is begonnen en hoe de waargenomen, zeer beperkte, genetische variatie is ontstaan? Is er een enkele introductie geweest van 1 genotype, waaruit de 3 subtypen zich vervolgens hebben ontwikkeld of zijn de verschillende subtypen gescheiden geïntroduceerd? Gedetailleerd fylogeografisch onderzoek waarbij een groot aantal genetische merkers wordt onderzocht van een representatieve populatie van genotype VGII/AFLP6 afkomstig uit verschillende delen van de wereld moet deze vraag beantwoorden. Verder wijst alles erop dat de uitbraak is veroorzaakt door een bijzonder virulente stam, maar onduidelijk is hoe deze virulentie is ontstaan. Mogelijk is er sprake van een gecompliceerde interactie tussen enerzijds de genetische achtergrond van de gist,<sup>10</sup> en mogelijke opgetreden veranderingen hierin, die hebben geresulteerd in een hoge mate van virulentie, en anderzijds mogelijke veranderingen in het milieu die hebben geleid tot een sterke expansie van de gistpopulatie.

Gezien het recente karakter van de uitbraak ligt het ook voor de hand om hierbij aan klimaatsveranderingen, en meer specifiek de toegenomen temperatuur, gedurende de laatste jaren van de vorige eeuw te denken als oorzaak voor deze expansie. Verder onderzoek zal echter moeten uitwijzen of dit een juiste veronderstelling is of dat er nog andere oorzaken zijn, bijvoorbeeld gerelateerd aan het microklimaat of wijzigingen in het lokale natuurbeheer. Duidelijk is dat er in ieder geval een fascinerend onderzoeksgebied wacht met vele interessante onderzoeksvragen, die alleen met een multifunctioneel team van onderzoekers adequaat beantwoord kunnen worden. Deze uitbraak van *C. gattii* wordt momenteel door diverse onderzoeksgroepen, met verschillende expertises onderzocht, waarbij diverse Noord-Amerikaanse en een Australische en Nederlandse onderzoeksgroep betrokken zijn.



Het artikel verscheen eerder in iets andere vorm in het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie (NTMM) 13e jaargang, nummer 2, mei 2005 met als titel: '*Cryptococcus neoformans* en *Cryptococcus gattii*'.

## Literatuur

1. Barreto de Oliveira, M.T., Boekhout, T., Theelen, B., Hagen, F., Baroni, F.C., Lazera, M., Lengeler, K.B., Heitman, J., Rivera, I.N.G. & Paula, C.R. (2003) *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1356-1359.
2. Bartlett, K.H. 2005. Canadian *Cryptococcus gattii* – temporary visa or landed immigrant. Abstract S13.1. In: 6th International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis, June 24-28, Boston, USA, pp. 71-72.
3. Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J.W., Hop, W.C.J., Abeln, E.C.A., Dromer, F. & Meyer, W. (2001) Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology (UK)* 147: 891-907.
4. Bovers, M., Hagen, F., Kuramae, E.E., Diaz, M.R., Spanjaard, L., Dromer, F., Hoogveld, H.L. & Boekhout, T. (2006) Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* (2006) *FEMS Yeast Res.* 6:599-607.
5. Casadevall, A. & Perfect, J. 1998. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, D.C., U.S.A., pp. 1-541.
6. Cogliati, M., Esposto, M.C., Clarke, D.L., Wickes, B.L. & Viviani, M.A. 2001. Origin of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* diploid strains. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3889-3894.
7. Dupont, B., Crewe Brown, H.H., Westermann, K., Martins, M.D., Rex, J.H., Lortholary, O. & Kauffmann C.A. 2000. Mycoses in AIDS. *Med. Mycol.* 38 Suppl.: 259-267.
8. Ellis, D.H. & Pfeiffer, T.J. 1990. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet.* 336: 923-925.
9. Escadón, P., Martínez, M., Sánchez, A., Meyer, W. & Castañeda, E. 2006. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res.* 6:625-635.
10. 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., and Heitman, J. 2005. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 437(7063):1360-1364
11. Hoang, L.M., Maguire, J.A., Doyle P., Fyfe M., Roscoe D.L. 2004 *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology *J. Med. Microbiol.* 53(Pt 9):935-940
12. Kidd, S., Hagen, F., Tschärke, R.L., Huynh, M., Bartkett, K.H., Fyfe, M., MacDougall, L., Boekhout, T., Kwon-Chung, J. & Meyer, W. 2004. Molecular epidemiology of the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada) revealed involvement of a rare genotype of *Cryptococcus gattii*. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.* 101: 17258-17263.
13. Kwon-Chung, K.J. (1998) *Filobasidiella* Kwon-Chung. In: *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. (Kurtzman, C.P. & Fell, J.W., eds). Elsevier Science Publ. Amsterdam, pp. 656-662.
14. Kwon-Chung, K.J., Boekhout, T., Fell, J.W. & Diaz, M. 2002. *Cryptococcus gattii* (Vanbreus. & Takashio) Kwon-Chung & Boekhout comb. nov. (Fungi, Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetoidea) and a proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii*. *Taxon* 51: 804-806.
15. Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I., and Bennett, J.E. 1982 Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol.* 15:535-537.
16. Lagrou, K., Van Eldere, J., Keuleers, S., Hagen, F., Merckx, R., Verhaegen, J., Peetermans, W. & Boekhout, T. 2005. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. *J. Intern. Med.* 257: 385-388.
17. Lazera, M.S., Pires, F.D., Camillo-Coura, L., Nishikawa, M.M., Bezerra, C.C., Trilles, L. & Wanke, B. 1996. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* 34: 127-131.
18. Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA, Allen JE, Bosdet IE, Brent MR, Chiu R, Doering TL, Donlin MJ, D'Souza CA, Fox DS, Grinberg V, Fu J, Fukushima M, Haas BJ, Huang JC, Janbon G, Jones SJ, Koo HL, Krzywinski MI, Kwon-Chung JK, Lengeler KB, Maiti R, Marra MA, Marra RE, Mathewson CA, Mitchell TG, Pertea M, Riggs FR, Salzberg SL, Schein JE, Shvartsbeyn A, Shin H, Shumway M, Specht CA, Suh BB, Tenney A, Utterback TR, Wickes BL, Wortman JR, Wye NH, Kronstad JW, Lodge JK, Heitman J, Davis RW, Fraser CM, Hyman RW. 2004. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science.* 307: 1321-1324.
19. MacDougall, L. and Fyfe, M. 2006. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a novel environment provides clues to its incubation period. *J Clin. Microbiol.* 2006 44:1851-1852.
20. McCarthy, K., Crewe-Brown, H.H., Maloba, M.R.B. & Hajjeh, R. 2003. The burden of cryptococcosis in Gauteng: results of population-based active surveillance: 2002-2003. *Comm. Dis. Surv. Bull. Nov.* 2003:10-12.
21. Meyer, W., Castañeda, A., Jackson, S., Huynh, M., Castañeda, E. & The Ibero-American cryptococcal study group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 189-195.
22. Nosanchuk, J.D., Shoham, S., Fries, B.C., Shapiro, D.S., Levitz, S.M. & Casadevall, A. 2000. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann. Intern. Med.* 132: 205-208.
23. Trilles, L., Lazera, M., Wanke, B., Theelen, B. & Boekhout, T. (2003) Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med. Mycol.* 41: 383-390.
24. Viviani, M.A., Cogliati, M., Esposto, M.C., Lemmer, K., Tintelnot, K., Valiente, M.F., Swinne, D., Velegriaki, A., Velho, R.; the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Cryptococcosis Working Group. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Res.* 2006 6:614-619.
25. Walenkamp, A.M.E., van Elden, L.J.R., Lipovsky, M.M., Reiss, p., Meis, J.F.G.M., de Marie, S., Dankert, J., Hoepelman, I.M. and the Dutch Cryptococcosis Study Group. Epidemiology of cryptococcosis in the Netherlands: a 12-year survey (1986-1999) and the effect of highly active antiretroviral therapy (HAART). *AIDS* 14: 2787-2788.