

Artículo original

Cryptococcus spp. en Venezuela y su relación con el biotipo del MicroScan®

Celina Pérez^{a,*}, Wendy Martínez^a, Heidi Reyes^b, Joel Torres^b, Arantza Roselló^a, Claudia Hartung^a,
María Teresa Colella^a, Carolina Olaizola^a, Sofía Mata^a

^aSección de Micología Médica, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela

^bLaboratorio de Micología, Hospital "Dr. Domingo Luciani"
Caracas - Venezuela

Recibido 13 de febrero de 2008; aceptado 30 de abril de 2008

Resumen: El lector del panel microbiológico automatizado autoScan®-4 detecta el crecimiento del hongo en diversos sustratos bioquímicos, presentes en los pozos de los paneles del MicroScan®. El propósito de este estudio fue relacionar el "biotipo" identificado por el MicroScan® con la especie causante de criptococosis, con el objeto de permitir una identificación en el menor tiempo posible. Se evaluaron 82 cepas de *Cryptococcus* spp. aisladas a partir de muestras clínicas entre 1995 y 2004. Para garantizar la pureza de las cepas, se realizó la identificación de las mismas por métodos convencionales; para identificar las especies se utilizó el medio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Se utilizó también el panel de identificación rápida de levaduras del MicroScan®, con el fin de determinar el "biotipo". El MicroScan® reveló 27 diferentes "biotipos". De los 82 aislados tipificados con el uso del medio CGB, el 91,46 % correspondieron a *C. neoformans* y 8,54 % a *C. gattii*. No se encontró una diferencia significativa entre los "biotipos" y las especies ($p > 0,05$). Sin embargo, se encontró significancia estadística entre las especies *C. gattii* y *C. neoformans* y la asimilación de *p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (NAG) ($p < 0,05$). El panel de identificación rápida de levaduras del MicroScan® no fue capaz de diferenciar ambas especies.

Palabras claves: *Cryptococcus* spp., *C. neoformans*, *C. gattii*, identificación automatizada, Biotipos, MicroScan®

Cryptococcus spp. in Venezuela and its relationship with the MicroScan® biotype

Abstract: The automated reader of the AutoScan® -4 microbiological panels detects fungi growth in various biological substrates present in the MicroScan® panel wells. The purpose of this study was to relate the biotype identified by the MicroScan® with the species causing the criptococosis, in order to obtain identification in the shortest possible period. The evaluation included 82 *Cryptococcus* spp. strains isolated from clinical samples between 1995 and 2004. To guarantee the purity of the strains they were also identified by conventional methods; to identify the species we used L-canavanin-glycine-bromthymol blue medium (CGB). We also used the fast yeast identification MicroScan® panel with the purpose of determining the "biotype". The MicroScan® revealed 27 different "biotypes". Of the 82 isolates typed with the CGB medium, 91.46% corresponded to *C. neoformans* and 8.5% to *C. gattii*. No significant difference was found among the "biotypes" and the species ($p < 0,05$). Nevertheless, there was a statistically significant difference between the assimilation of *p*-nitrophenil-N-acetyl-β-D-glucosamine (NAG) ($p < 0,05$) by the *C. gattii* and the *C. neoformans* species. The fast yeast identification MicroScan® panel was not able to differentiate between both species.

Keywords: *Cryptococcus* spp., *C. neoformans*, *C. gattii*, automated identification, biotypes, MicroScan®

* Correspondencia:

Email: celinaperezdesalazar@gmail.com

Introducción

Cryptococcus neoformans, seguido de *Cryptococcus gattii*, son levaduras de importancia médica, que originan enfermedad respiratoria y meningoencefalitis, potencialmente fatales tanto en humanos como en animales. La criptococosis humana se desarrolla luego de efectuarse la exposición ambiental y la inhalación de las levaduras [1-4].

Evans en los años 50 y Wilson y col. en 1968, reportaron la presencia de 4 serotipos diferentes, entre los cuales están los serotipos A y D pertenecientes a *C. neoformans var neoformans* y los serotipos B y C, pertenecientes a *C. neoformans var gattii* [5-7]. Posteriormente Bennett y col. en 1978 encontraron diferencias bioquímicas entre ambas variedades [8].

Para el año 2004, debido a diferencias ecológicas, morfológicas, bioquímicas, serológicas y actualmente

moleculares (como la presencia de las secuencias de diversos genes: *URA5*, *CnLAC*, *CAP59*, *CAP64* y *IGS*, entre otros y su relación filogenética), *C. neoformans var gattii*, ha sido elevado al nivel de especie. Por tal motivo, *C. neoformans var neoformans* es considerado ahora *C. neoformans* y *C. neoformans var gattii* como *C. gattii*, cada uno con sus respectivos serotipos [1,8-14].

Se han encontrado diferencias en la distribución geográfica de las 2 especies antes mencionadas. *C. neoformans* es cosmopolita, mientras que *C. gattii* está restringido a regiones tropicales y subtropicales, entre las cuales se encuentran Australia, Brasil, Camboya, Hawái, Sur de California, Méjico, Paraguay, Tailandia, Vietnam, Nepal y África Central. En estas áreas, *C. gattii* puede representar más del 35% de las cepas aisladas. *C. neoformans* se ha aislado de diversas fuentes ambientales, como por ejemplo excretas de palomas, trozos de madera y frutas en descomposición, entre otras; mientras que *C. gattii* se ha aislado de los árboles de eucaliptos y almendros, de guano de murciélagos y de colmena de avispas de la especie *Polybia occidentalis* [1-3,15-43]. Es infrecuente la incidencia de casos de criptococosis causados por *C. gattii* en pacientes inmunocompetentes; la razón de este hecho no se conoce. Sin embargo, es bien conocido que el principal factor de riesgo para adquirir la infección por estas especies de micetos, es la exposición ambiental [1,15-19,22-23,25,27,28,30,31,35].

En Venezuela sólo existe un reporte de serotipos de *Cryptococcus* aislados a partir de muestras clínicas, en donde de 27 aislados se identificaron 63% del serotipo A, 29% del serotipo B, 4% serotipo D y el resto, un 4% no tipificables [44].

La identificación rutinaria de este género de levaduras, incluye: examen macroscópico de las colonias, examen microscópico con tinta china, diversas pruebas bioquímicas como la prueba de ureasa, el auxanograma, utilización de la enzima difenoloxidasa, y para la identificación de especie la utilización del medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), entre otras, las cuales consumen un tiempo considerable en su realización [45-51].

Existe en la literatura otra técnica para la identificación de especies la cual fue introducida por Dufait en 1987, con el fin de acelerar este proceso. La misma se basa en la capacidad de *C. gattii* de asimilar D-prolina. Sin embargo, esta técnica no ha sido ampliamente utilizada debido a su alto costo [52].

Entre los métodos de identificación automatizada se encuentra el lector del panel microbiológico automatizado autoScan[®]-4, que utiliza un sistema óptico con el objeto de detectar el crecimiento fúngico en los pozos de los paneles del MicroScan[®]. La identificación de determinada levadura se realiza al observar cambios específicos de color en los pozos, los cuales poseen diversos sustratos (prueba bioquímica) y dependiendo de los sustratos asimilados se le otorga un número al resultado del panel, al cual se le denomina "biotipo". El uso de esta técnica implica una disminución de personal especializado y del tiempo de emisión de un resultado [53].

Debido a las diferencias epidemiológicas observadas entre las cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* obtenidas a partir de muestras clínicas de pacientes, se hace necesario identificar correctamente la especie aislada. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue determinar si los biotipos obtenidos por el MicroScan[®] al estudiar las levaduras de *Cryptococcus* spp., son lo suficientemente discriminativos para su identificación a nivel de especie.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 82 cepas de *Cryptococcus* spp. aisladas de muestras clínicas de pacientes con criptococosis entre 1995-2004, procedentes del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene y de la Sección de Micología Médica del Instituto de Medicina Tropical. Las mismas se encontraban mantenidas por el método de Castellani [54,55].

Se utilizaron cepas de control donadas por el Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene, entre las cuales se encontraban 3 cepas autóctonas: *C. neoformans* serotipo A (L-412000-158), *C. neoformans* serotipo D (L-412000-161), *C. gattii* serotipo C (L-412000-160), y por último, una originaria de Bélgica, *C. gattii* serotipo B (IHEM-4164). Las mismas también se encontraban mantenidas por el método de Castellani.

Luego de realizar los subcultivos a partir del agua en el medio agar Sabouraud, con el fin de asegurar la pureza de la cepa, se efectuó la identificación de las especies mediante el uso de los métodos convencionales. Las cepas fueron identificadas por la morfología de las colonias, la presencia de cápsula, la forma de la levadura, la termotolerancia, la prueba de ureasa y el auxanograma. Se determinó la producción de la enzima difenoloxidasa al usar el medio de agar Staib [45,47,49,50].

Se realizó la siembra en el medio de CGB, incubado a 28°C por 5 días [51]. Los resultados fueron evaluados de la siguiente manera: la ausencia de un cambio de color (color amarillo-verdoso), se consideró como *C. neoformans*; el cambio de color del medio a un azul cobalto, como *C. gattii*.

Por último, se efectuó la identificación por el método automatizado, con las placas de identificación rápida para levaduras MicroScan[®], para lo cual se siguieron las especificaciones del manual del operador, con el objeto de determinar el "biotipo" [53].

Para el análisis estadístico se utilizó estadística descriptiva. Se determinaron frecuencias y porcentajes. Para la comparación y el análisis de los resultados se utilizó la prueba exacta de Fisher (dos colas). Las diferencias fueron consideradas significativas con una $p < 0,05$.

Resultados

Todos los aislados evaluados mediante el uso de métodos convencionales fueron identificados como *Cryptococcus* spp.

De los 82 aislados sembrados en el medio CGB, el 91,46% (n=75) fueron *C. neoformans* y el 8,54% (n=7)

fueron identificados como *C. gattii*. Las cepas controles arrojaron los resultados esperados. Las placas de identificación rápida para levaduras MicroScan® revelaron 27 "biotipos" diferentes. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes "biotipos" y las especies de *Cryptococcus* identificadas ($p > 0,05$). Sin embargo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre *C. neoformans* y *C. gattii* y la capacidad de asimilación de *p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (NAG) ($p = 0,0236$). (Tabla 1).

Discusión

En Venezuela se desconoce la prevalencia de *Cryptococcus* spp. entre los aislados de muestras clínicas, ya que son escasos los reportes que incluyen el estudio de las especies [44].

Tabla 1: Número de "biotipo" arrojado por el autoscan®-4 y sustratos asimilados con las placas de identificación rápida para levaduras Microscan®, según la especie *C. neoformans* o *C. gattii*.

Biotipo	Sustrato	<i>C. neoformans</i>		<i>C. gattii</i>		Total	
		N°	%	N°	%	N°	%
000-040-000	URE	2	2,67	0	0,00	2	2,44
000-040-004	URE,NAG	11	14,67	2	28,57	13	15,85
000-040-024	URE,NAG,BDF	2	2,67	0	0,00	2	2,44
000-040-040	URE,AGL1	1	1,33	0	0,00	1	1,22
000-040-044	URE,NAG,AGL2	8	10,67	0	0,00	8	9,76
000-042-004	URE,NAG,SUC2	5	6,67	0	0,00	5	6,10
000-042-024	URE,NAG,SUC2,BDF	1	1,33	0	0,00	1	1,22
000-042-040	URE,AGL2,SUC2	1	1,33	0	0,00	1	1,22
000-042-044	URE,NAG,AGL2,SUC2	7	9,33	0	0,00	7	8,54
000-060-004	URE,NAG	1	1,33	1	14,29	2	2,44
001-040-024	URE,NAG,BDF,AARG	1	1,33	0	0,00	1	1,22
002-040-000	URE,GLPR	0	0,00	1	14,29	1	1,22
002-040-004	URE,NAG,GLPR	9	12,00	1	14,29	10	12,20
002-040-040	URE,AGL2,GLPR	1	1,33	0	0,00	1	1,22
002-040-044	URE,NAG,AGL2,GLPR	3	4,00	0	0,00	3	3,66
002-042-000	URE,GLPR,SUC2	0	0,00	1	14,29	1	1,22
002-042-004	URE,NAG,GLPR,SUC2	6	8,00	0	0,00	6	7,32
002-042-024	URE,NAG,GLPR,SUC2,BDF	1	1,33	0	0,00	1	1,22
002-042-044	URE,AGL2,NAG,GLPR,SUC2	1	1,33	0	0,00	1	1,22
002-060-044	URE,NAG,AGL2,GLPR,IDX	1	1,33	0	0,00	1	1,22
002-062-044	URE,NAG,GLPR,SUC2,AGL2,IDX	2	2,67	0	0,00	2	2,44
002-240-004	LYAL,URE,NAG,GLPR	0	0,00	1	14,29	1	1,22
003-040-004	URE,NAG,GLPR,AARG	3	4,00	0	0,00	3	3,66
003-040-044	URE,NAG,AGL2,GLPR,AARG	3	4,00	0	0,00	3	3,66
003-042-004	URE,NAG,GLPR,SUC2,AARG	3	4,00	0	0,00	3	3,66
003-042-044	URE,AGL2,NAG,GLPR,SUC2,AARG	1	1,33	0	0,00	1	1,22
003-442-044	LYAL,URE,AGL2,NAG,GLPR,SUC2,AARG	1	1,33	0	0,00	1	1,22
Total		75	100,00	7	100,00	82	100,00

($p > 0,05$)

HPR: Hidroxiprolina-β-Naftilamida; ILE: L-Isoleucina-β-Naftilamida; PRO: L-Prolina-β-Naftilamida; TYR: L-Tirosina-β-Naftilamida; GLY: Glicina-β-Naftilamida; GGLY: Glicilglicina-β-Naftilamida; GLAR: Glicil-L-Arginina-4-Metoxi-β-Naftilamida; GLPR: Glicil-L-Prolina-4-Metoxi-β-Naftilamida; AARG: L-Arginil-L-Arginina-β-Naftilamida; LYAL: L-Lisil-L-Alanina-4-Metoxi-β-Naftilamida; ALA: L-Alanina-4-Metoxi-β-Naftilamida; STY: L-Seril-L-Tirosina-β-Naftilamida; URE: Urea; IDX: 3-Indoxil Fosfato; HIS: L-Histidina-β-Naftilamida; SUC1: Sacarosa; SUC2: Sacarosa; TRE: Trehalosa; AGL1: *p*-Nitrofenil-α-D-Glucopiranosido; AGL2: *p*-Nitrofenil-α-D-Glucopiranosido; BGL: *p*-Nitrofenil-β-D-Glucopiranosido; BGAL: *o*-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosido; BDF: *p*-Nitrofenil-β-Fucopiranosido; AGAL: *p*-Nitrofenil-α-D-Galactopiranosido; NAG: *p*-Nitrofenil-N-Acetil-β-D-Glucosamina; CELL: *p*-Nitrofenil-β-D-Celobiosa; NGAL: *p*-Nitrofenil-N-Acetil-β-D-Galactosamina.

Los centros de referencia para el diagnóstico de las micosis, identifican generalmente el hongo en los cultivos de rutina solo hasta nivel de género. Para simplificar la identificación hasta el nivel de especie de estos micetos, sería de gran interés poder recurrir a métodos automatizados.

En este estudio se utilizó el medio CGB [51] encontrándose que había un 91,46% de *C. neoformans*, y sólo un 8,54% de *C. gattii*. El equipo automatizado generó 27 "biotipos" diferentes. No se demostró una relación entre el "biotipo" emitido por el equipo automatizado y las especies identificadas con el medio CGB.

El medio CGB emplea glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, siendo el sulfato de L-canavanina el compuesto que ayuda a la tipificación de ambas especies. *C. gattii* metaboliza dicho compuesto alcalinizando el medio, por lo cual vira el color a azul cobalto; *C. neoformans* no lo utiliza permaneciendo el medio del color original [51].

Es de hacer notar que el panel para la identificación de levaduras contiene glicina, compuesto que forma parte del medio CGB, pero en sus diferentes isoformas: Glicina- β -Naftilamida (GLY), Glicilglicina- β -Naftilamida (GGLY), Glicil-L-Arginina-4-Metoxi- β -Naftilamida (GLAR) y Glicil-L-Prolina-4-Metoxi- β -Naftilamida (GLPR). Ninguna de las dos especies asimiló los sustratos GLY, GGLY, GLAR, por lo cual nos planteamos que la glicina no debe ser la única fuente de carbono y/o de nitrógeno en el medio CGB y que las isoformas de glicina, utilizadas en el panel de identificación automatizada, no son las isoformas adecuadas para identificar *Cryptococcus* spp. [53].

Así mismo, la técnica de identificación de *C. neoformans/C. gattii* de Dufait, establece que *C. gattii* tiene la capacidad de asimilar D-prolina [52]. El panel de identificación rápida para levaduras tiene sustratos contentivos de L-prolina (HPR y PRO). En este estudio ninguno de los aislados de *C. gattii* asimiló dicho compuesto en el método automatizado, lo cual corrobora lo indicado por Dufait.

Aunque se encontraron diferencias significativas entre el sustrato asimilado NAG y las especies evaluadas, este hallazgo no se puede generalizar puesto que el número de aislados de *C. gattii* fue escaso. Con este estudio podemos afirmar que el sistema automatizado, conformado por las placas de identificación rápida para levaduras MicroScan[®], fue incapaz de diferenciar ambas especies: *C. neoformans* y *C. gattii*. Por lo tanto, el medio CGB [51,56] sigue representando la forma más apropiada de determinar las mismas.

Agradecimiento

Queremos agradecer a la Lic. Mercedes Panizo, del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene, en Caracas, por el suministro de las cepas de origen clínico y por las cepas de control. A la Lic. Inés Parra, del Departamento de Medios de Cultivo, del Instituto Nacional de Higiene, por la preparación del medio

CGB. Este estudio fue parcialmente financiado por el CDCH, Proyecto N°: PI 09-00-5384-2004 y, por el Proyecto Fonacit N°: LAB-2000001587.

Referencias

- Mitchell T, Perfect J. Cryptococcosis in the era of AIDS: 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995; 8:515-48.
- Negróni R. Micosis en pacientes con SIDA. Rev Argent Micol 1990; 13:3-14.
- Kwon-Chung KJ, Sorrell TC, Dromer F, Fung E, Levitz SM. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. Med Mycol 2000; 38(Suppl 1): 205-13.
- Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med Mycol 2001; 39:155-68.
- Wilson DE, Bennett JE, Bailey JW. Serologic grouping of *C. neoformans*. Proc Soc Exp Biol Med 1968; 127: 820-3.
- Evans EE. The antigenic composition of *C. neoformans*. J Immunol 1950; 64: 423-30.
- Evans EE, Kessel JF. Serologic grouping of *C. neoformans*. J Immunol 1951; 67: 109.
- Bennett J, Kwon Chung K, Theodore T. Biochemical differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Sabouraudia 1978; 16:167-74.
- Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *C. neoformans* B and C serotypes. Mycologia 1976; 68: 942-6.
- Vanbreuseghem R, Takashio M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. Part II. *C. neoformans* var *gattii* var nov. Ann Soc Belg Med Trop 1970; 50: 695-702.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Theodore TS. *Cryptococcus bacillisporus* nov: serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. Int J Syst Bacteriol 1978; 28: 616-20.
- Diaz M, Boekhout T, Theelen B, Fell J. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. Syst Appl Microbiol 2000; 23:535-45.
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell J, Hop W, Abeln E, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 2001; 147:891-907.
- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Díaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). Taxon 2002; 51:804-6.
- Bennett J, Kwon Chung K, Howard D. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol 1977; 105:582-6.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol 1984; 120: 123-30.
- Ordoñez N, Castañeda E. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 128-30.
- Carrada T, Campo M, Albarran M, Carrillo J. Estudio epidemiológico del *Cryptococcus neoformans* en México. Rev Invest Salud Pública 1971; 31:92-104.
- Lima SC, Sakata E, Rocha CE, Yasuda PH, Stiliano SV, Ribeiro FA. Variedades y serotipos de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA y neurocriptococosis en Sao Paulo, Brasil. Rev Inst Med trop Sao Paulo 1990; 32:480-2.

20. Vijaya D, Anand BH, Nagarathnamma T. Case report. Disseminated cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host. *Mycoses* 2001; 44:113-4.
21. Arteaga E, Capó V, Pérez ML. Micosis oportunistas invasivas en el SIDA. Un estudio de 211 autopsias. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15:33-5.
22. Helou, S, Robles AM, Arechavala A, Bianchi M, Negroni R. Criptococcosis respiratoria en pacientes VIH positivos. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16:126-9.
23. Severo LC, Berta I, Londero AT. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. *Rev Iber Micol* 2001; 18: 200-1.
24. Murakawa G, Kerschmann R, Berger T. Cutaneous *Cryptococcus* infection and AIDS. *Arch Dermatol* 1996; 132:545-7.
25. Bava AJ, Negroni R, Arechavala A, Robles AM, Bianchi M. Cryptococcosis associated with AIDS in the Muniz Hospital of Buenos Aires. *Mycopathologia* 1997; 140:13-7.
26. Bottone EJ, Kirschner PA, Salk IF. Isolation of highly encapsulate *Cryptococcus neoformans* serotype B from a patient in New York City. *J Clin Microbiol* 1986; 23:186-8.
27. Shimizu RY, Howard DH, Clancy MN. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1986; 154:1042.
28. Rinaldi MG, Drutz DJ, Howell A, Sande MA, Woesy CB, Hadley WK. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1986; 153:642.
29. Bava A, Negroni R. Características epidemiológicas de 105 casos de criptococcosis diagnosticados en la República Argentina entre 1981-1990. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 34(4):335-40.
30. Clancy MN, Fleischmann J, Howard DH, Kwon-Chung KJ, Shimizu RY. Isolations of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from a patient with AIDS in Southern California. *J Infect Dis* 1990; 161:809.
31. Dromer F, Ronin O, Dupont B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from an Asian patient in France. Evidence for dormant infection in healthy subjects. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:395-7.
32. Merheb JC, García J. Infecciones micóticas en pacientes inmunocomprometidos: estudio anatomopatológico de 404 necropsias. *Antibióticos e Infección* 1991; 1:12-7.
33. Levy RM, Bredesen DE, Roseblum ML. Opportunistic central nervous system pathology in patients with AIDS. *Ann Neurol* 1988; 23:S7-S12.
34. Medoff G, Kobayashi GS. Systemic fungal infections: an overview. *Hosp Pract* 1991; 15:41-52.
35. Calvo B, Colombo A, Fischman O, Thompson L, Lazera M, Telles F, et al. Antifungal susceptibilities, varieties and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile and Venezuela. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2348-50.
36. Rivera M, Alayo E, Balliache N, Marín A, Bessignano N, Fernández H. Micosis sistémicas asociadas a infección por VIH. *Bol Venez Infectol* 2004; 15(2):30-1.
37. Panizo M, Reviákina V, Dolande M. Casuística del aislamiento de levaduras en muestras clínicas (2001-2003). *Bol Venez Infectol* 2004; 15(2):16-7.
38. Sorrell T, Ellis D. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14:42-3.
39. Malik R, Wigney DJ, Muir DB, Gregory DJ, Love DN. Criptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 133-44.
40. Lazera M, Pires F, Camilo-Coura L, Nishikawa M, Bezerra C, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol* 1996; 34:127-31.
41. Castanón LR, López R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses* 1994; 37:325-7.
42. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1642-4.
43. Muchmore HG, Scott EN, Felton FG, Fromtling RA. *Cryptococcus neoformans* serotypes groups encountered in Oklahoma. *Am J Epidemiol* 1980; 112:32-8.
44. Villanueva E, Mendoza M, Torres E, Albornoz M. Serotipificación de 27 cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas en Venezuela. *Acta Científica Venezolana* 1989; 40:151-4.
45. Lacaz C, Porto E, Heins EM, Takahashi N. Identificação dos Fungos. En: *Guía para Identificação de Fungos Actinomicetos-Algas de interesse médico*. Savier. Sao Paulo. 1998. pp 94-123.
46. Sidrim JJC, Morelra JLB. Diagnóstico laboratorial das leveduras. En: Sidrim JJC. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da Micología Médica*. Editorial Guanabara Koagan S.A. Rio de Janeiro. 1999. pp 76-89.
47. Goitia K, Pérez C, Mata S, Hartung C, Colella MT, Hernández C, Villarroel M, Reyes H, Ontiveros Y, Magaldi S, Suarez R. Utilización del caldo úrea de Stuart para el test de la ureasa, como prueba en el diagnóstico de las levaduras. *Rev Soc Ven Microb* 2002; 22:136-40.
48. Mickelsen PA, McCarthy R, Propst MA. Further modifications of the auxanographic method for identification of yeasts. *J Clin Microbiol* 1977; 5:297-301.
49. Pérez C, Hernández Y, Colella M, Roselló A, Hartung C, Olaizola C, Mata S. Identificación de *Cryptococcus sp.* mediante el auxanograma modificado por Araujo. *Kasmera* 2004; 32:16-26.
50. Nardelli V, Pérez C, Mata S, Colella MT, Roselló A, Hartung C, Landaeta ME, Olaizola C, Magaldi S. Identification of *Cryptococcus neoformans* isolates using Staib agar without creatinine. *Kasmera* 2005; 33:102-8.
51. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotypes A y D) *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotypes B y C). *J Clin Microbiol* 1982; 15:535-7.
52. Dufait R, Velho R, De Vroey C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen* 1987; 10:483.
53. Guy ST, Beauchesne D. Evaluation of MicroScan Rapid Yeast identification panel. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2296-9.
54. Hartung C, Navas T, Dolande M, Guaimare G, Reviákina V. Patogenicidad del *Cryptococcus neoformans* conservado en agua según Castellani. *Rev Inst Nac Hig Rafael Rangel* 1991; 22(3):19-22.
55. Pérez C, Mata S, Hartung C, Rosello A, Colella MT, Olaizola C, Landaeta ME. Mantenimiento de *Cryptococcus sp.* con el método de Castellani. *Rev Soc Ven Microb* 2003; 23:153-7.
56. Pérez C, Hernández Y, Colella MT, Rosello A, Hartung C, Olaizola C, Magaldi S, Mata S. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var *gattii* mediante el uso del medio CGB. *Rev Soc Ven Microb* 2003; 23:158-62.