

Identificación de *Cryptococcus* sp., mediante el Auxonograma modificado por Araujo

Identification of Cryptococcus sp., through the Auxonogram Method Modified by Araujo

**Pérez, Celina; Hernández, Yumaira;
Colella, María Teresa; Roselló, Arantza; Hartung de Capriles, Claudia;
Olaizola, Carolina; Magaldi, Sylvia
y Mata-Essayag, Sofia**

Sección de Micología Médica, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal 47423, Caracas 1041, Venezuela. E-mail: somae50@hotmail.com

Resumen

Se identificaron 43 cepas de *C. neoformans*, mediante el uso de la prueba de auxonograma utilizando la técnica de Araujo, la cual es una modificación del método de Beijerinck. Los resultados obtenidos con esta técnica fueron similares a lo observado con la identificación automatizada con el MicroScan[®] DADE BEHRING. Los datos demostrados nos permiten afirmar que la técnica evaluada es efectiva, poco costosa y fácil de utilizar en un laboratorio de pocos recursos.

Palabras clave:

Cryptococcus sp., auxonograma, identificación.

Abstract

Identification of 43 *C. neoformans* isolates from human sources were performed using the Beijerinck auxonogram method modified by Araujo and the MicroScan[®] DADE BEHRING automatic test. Identification of the isolates was achieved reliably by both tests. Therefore the Araujo Auxonogram method may be applied in small laboratories with limited resources as an inexpensive, simple and reliable method.

Palabras clave:

Cryptococcus sp., auxonogram, identification.

Recibido: 21-01-04 / Aceptado: 30-01-04

Introducción

El aumento de la frecuencia y gravedad de las micosis ha sido una tendencia clara, en las últimas 2 décadas del siglo XX, todo esto como consecuencia del incremento del tamaño de la población de riesgo debido principalmente a la aparición de enfermedades debilitantes tales como el SIDA, el uso cada vez más frecuente de antineoplásicos e inmunosupresores potentes para el tratamiento del cáncer, receptores de transplantes y enfermedades autoinmunes, y la desnutrición entre otras causas. Las levaduras usualmente implicadas son las del género *Candida* y *Cryptococcus* [4, 15, 29, 52].

La criptococosis habitualmente producida por *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*, es la cuarta enfermedad infecciosa grave, que causa frecuentemente la muerte en los enfermos con SIDA, en los Estados Unidos y en Europa [4, 7, 29, 31, 35, 40, 52]. En los países en desarrollo, su incidencia es mayor, así en África Central es, junto con la tuberculosis, la infección más común y se calcula que alrededor del 20% de los enfermos con SIDA padecen de esta enfermedad [29]. Lamentablemente en Venezuela, no existen cifras oficiales que reflejen el comportamiento de esta micosis.

C. neoformans es una levadura globosa, circundada de una cápsula mucilaginosa muy espesa al estado parasitario, menos gruesa al estado saprofítico, por lo que las células tienen un tamaño variable entre 3 y 20 μ m. La cápsula confiere a las colonias de

Cryptococcus un aspecto mucoso filante.

La criptococosis se encuentra en todo el mundo. Se adquiere por vía inhalatoria, por lo que la enfermedad se manifiesta más frecuentemente con lesiones pulmonares en un 30-40% de los casos y a nivel del sistema nervioso central en un 75-90% de los mismos [11, 29]. También se han reportado afecciones en la piel, huesos, retina, glándulas suprarrenales, corazón, vías digestivas, peritoneo, riñones y próstata. La mortalidad producida por este miceto es de un 10-25% [11, 13, 23, 24, 30, 35, 38].

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la demostración de la levadura en el líquido cefalorraquídeo, esputo u otro material clínico-patológico, mediante el examen en fresco con tinta china, poniéndose en evidencia por contraste, la cápsula incolora alrededor de las células de la levadura [3, 8, 14, 26, 47, 54]. En oportunidades, resulta difícil realizar la identificación a través del examen en fresco, debido a que el mismo puede resultar negativo o a que la levadura correspondiente a *Cryptococcus* sp. no presente cápsula, situación esta en donde se pudiese practicar un diagnóstico de especie errado con levaduras del género *Candida* [22, 47].

La serología constituye una valiosa ayuda para el diagnóstico, por la prontitud del resultado. Consiste en la demostración del antígeno capsular en el suero, líquido cefalorraquídeo u orina, a través de la prueba de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas, test este denominado Cryptolátex, el cual presenta una elevada sensibilidad y especificidad para muestras de líquido cefalorraquídeo, siendo menor estos parámetros, en muestras de suero y orina [10, 16, 20, 22, 34, 51].

A pesar de contar con herramientas tan valiosas como el examen directo y la serología, se deben dedicar todos los esfuerzos para aislar el agente causal a partir del cultivo de las muestras clínicas, con la finalidad de confirmar el diagnóstico [3, 28, 36, 48].

El cultivo de *Cryptococcus* sp a temperatura ambiente, produce colonias levaduriformes de aspecto mucoide, color blancocrema, sobre los medios de cultivo tradicionales como Sabouraud, Sablac y Casero o Lactritmel. La cápsula se evidencia mejor creciendo sobre el medio de Sablac, a una temperatura de 35-37°C [26, 28, 36, 48].

Desafortunadamente, si el paciente ha recibido tratamiento antifúngico previo, resulta difícil el crecimiento del hongo en los medios convencionales, siendo un reto realizar el aislamiento y diagnóstico de la cepa en estudio [20].

En la actualidad, se han desarrollado múltiples métodos automatizados como el API o el MicroScan[®], entre otros, con la finalidad de simplificar y acelerar la identificación de los hongos, los cuales tienen la desventaja de ser muy costosos y además, pueden

originar diagnósticos errados cuando se evalúan cepas cuyo comportamiento bioquímico o enzimático no es el habitual [48].

Para la identificación de las especies de *Cryptococcus* sp. también es de utilidad la prueba del auxanograma, en donde se evalúa la capacidad del microorganismo de utilizar diversos carbonos o sustancias nitrogenadas como fuente de crecimiento, en presencia de oxígeno como donador de electrones. La misma se puede efectuar tanto en medio líquido como en medio sólido [22, 41].

Existen varios métodos tradicionales para realizar dicha prueba entre los cuales podemos mencionar, el test en medio líquido, técnica de Wickerham, la cual consiste en que a cada tubo que contiene un caldo nutritivo se le agrega una suspensión de la cepa en estudio y la fuente de carbono o de nitrógeno a evaluar. La asimilación del mismo se reconocerá por una mayor turbidez del medio [22, 39]. La desventaja de este procedimiento es la de utilizar gran cantidad de material de vidrio, medios de cultivo y de los compuestos nutricionales a evaluar, lo que conlleva a un aumento de los costos; importante aspecto este a considerar en un laboratorio de escasos recursos económicos.

Otra prueba es la que se hace utilizando un medio agarizado, denominada técnica de Beijerinck, la cual consiste en preparar una suspensión del inóculo de la cepa en estudio y mezclarla con el medio de Beijerinck [36]. Posteriormente se le agregan las sustancias nutricionales a estudiar de la siguiente manera: con la ayuda de la esquina de una lámina flexible se trasladan pequeñas cantidades de las sustancias en forma de polvo a evaluar y se colocan sobre la superficie del medio. Esta técnica así como el medio de Beijerinck, han sufrido múltiples modificaciones con el tiempo, con la finalidad de simplificar la misma y obtener una mejor precisión de la prueba [1, 22, 27, 32, 39, 41].

En este sentido todas las técnicas antes mencionadas son consideradas engorrosas, laboriosas y que consumen mucho tiempo. Por tales motivos se ha desechado el uso de estos métodos convencionales, sustituyéndolos por los métodos automatizados, los cuales resultan costosos.

En 1965, Araujo introdujo una modificación a la técnica de Beijerinck con el objetivo de simplificar el procedimiento, mantener su efectividad y disminuir el costo de la misma, la cual ha sido poco divulgada [2].

Esta técnica se realiza sobre un medio de cultivo agarizado, utilizando el medio de Lodder, el cual es una modificación del medio de Beijerinck [36]. En donde el inóculo a estudiar se incluye en el medio fundido y se vierte sobre una placa de Petri, para dejar solidificar. Se usa la punta de una aguja de inoculación estéril, la cual se humedece con agua esterilizada, se toma una mínima cantidad de cada una de las

substancias carbonadas o nitrogenadas a estudiar y se aplican en el medio, introduciendo la punta de la aguja de inoculación de manera perpendicular sobre la superficie del mismo [2, 36].

Como las levaduras del género *Cryptococcus* no son fermentadoras, no se requiere complementar la prueba de auxanograma con la realización del zimograma, para la identificación de la especie [6, 26, 37].

Por todo lo antes expuesto el propósito del presente trabajo fue evaluar la Prueba del Auxonograma por la Técnica de Araujo, comparando los resultados obtenidos por Lodder y Rippon, y con el Método automatizado MicroScan[®] DADE BEHRING, con el objetivo de identificar especies de *Cryptococcus* sp.

Materiales y Métodos

Cepas estudiadas

Se utilizaron 43 cepas de *Cryptococcus* sp. de las cuales, 17 fueron aisladas de muestras de líquido cefalorraquídeo recibidas y procesadas en la Sección de Micología Médica del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela, entre enero de 2001 y diciembre de 2002; dichas muestras provenían de pacientes con sospecha de criptocosis del Hospital Universitario de Caracas y de otros hospitales del área metropolitana de Caracas. Las 26 cepas restantes provenían de la micoteca de esta Sección, las cuales fueron aisladas de diversas muestras clínicas y conservadas en dicha micoteca utilizando el método de Castellani, siendo introducidas en el agua destilada entre los años 1962 y 2000.

Procesamiento de las cepas estudiadas

Procesamiento de las cepas conservadas en agua: Para poder evaluar las cepas de la micoteca conservadas en los tubos con agua destilada, se procedió a realizar la antisepsia con alcohol de la tapa de bakelita; se agitó el tubo para no dejar sedimento y se vertió el contenido del mismo en un tubo con medio de Sablac; se colocaron en estufa a 35°C hasta observar el crecimiento de las colonias.

Identificación automatizada: Todas las cepas estudiadas, se identificaron a través del método automatizado MicroScan[®] DADE BEHRING [37, 41], utilizando los paneles de identificación rápida de levaduras.

A partir de un cultivo de 48 horas de crecimiento a 35°C en el medio de Sablac, se procedió a preparar un inóculo de cada cepa, mezclando suficiente material del cultivo arrastrado con el asa y diluyéndolo en 2 cc de agua destilada estéril, hasta obtener una densidad de 0,5 Mac Farland. Se distribuyó el inóculo a razón de 50 µL

en cada uno de los pozos de los paneles de identificación. Los paneles se sellaron con Parafilm y se colocaron en la estufa a 35°C por 4 horas. Posteriormente, se procesaron de manera automatizada en el aparato de MicroScan® DADE BEHRING, para la identificación de la especie.

Prueba de la ureasa: Todas las cepas estudiadas fueron evaluadas con el Caldo Urea de Stuart [25, 36]. Las cepas control utilizadas fueron *C. neoformans* (WC 1400 IMT) para control positivo y como control negativo *Candida albicans* (ATCC 90028).

Los medios de cultivo se observaron diariamente, hasta un máximo de 5 días. La reacción que se evaluó fue el viraje del color del medio de amarillo a fucsia, lo cual indica la hidrólisis de la urea.

Medios utilizados para la prueba de auxonograma:

- Medio para la asimilación de carbonos (Medio de Lodder): sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,0 g, fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 1,0 g, sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, agar 20 g, agua destilada 1000 cc [25].
- Medio para la asimilación de nitratos (Medio de Lodder): dextrosa 20 g, fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 1,0 g, sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, agar 20 g, agua destilada 1000 cc [25].

Para la preparación de los medios de cultivo, se disolvieron todos los compuestos. Se distribuyeron en alícuotas de 40 cc cada uno, para la asimilación de carbonos y en alícuotas de 20 cc para la asimilación de nitrógeno; se esterilizaron en autoclave a 20 Lb por 15 min. Para el momento de aplicar la técnica, se diluyeron los medios de cultivo y se mantuvieron a 56°C.

Se preparó el inóculo de la cepa, arrastrando la mayor cantidad de colonias posibles a partir de un cultivo en medio de Sablac de 48 horas de crecimiento a 35°C y se mezcló en un tubo con 3 cc de agua destilada estéril, hasta obtener una turbidez de 5 Mac Farland o en su defecto, hasta lograr un inóculo grueso.

Dos cc (2 cc) de este inóculo se vertieron en el tubo que contenía 40 cc del medio para la asimilación de carbonos, se mezcló manualmente y se colocó en una placa de Petri de 18 cm de diámetro. La cantidad de inóculo restante (1 cc), se vertió en el tubo con el medio para la asimilación de nitrógeno, se mezcló manualmente y se colocó en una placa de Petri de 8 cm de diámetro.

Una vez solidificado el medio, se rotuló el fondo de ambas placas de Petri con un

número asignado a cada una de las sustancias a evaluar. Las fuentes de carbono a estudiar fueron: sacarosa, maltosa, melibiosa, eritritol, lactosa, galactitol, inositol. El nitrato se utilizó como la fuente nitrogenada a evaluar. Todo lo anterior de acuerdo con Lodder y Rippon [37, 41]. La glucosa se utilizó como patrón de referencia de asimilación de la fuente carbonada y, la peptona como patrón de referencia de asimilación del compuesto nitrogenado. Se evaluó, así mismo la asimilación de la creatinina, como fuente nitrogenada [26, 27, 37, 41].

Técnica de Araujo

Se utilizó la técnica de Araujo, la cual es una modificación del método de Beijerinck. Usando una aguja de inoculación previamente esterilizada con un mechero, se humedeció 2 mm de la punta de la misma con agua estéril y, posteriormente se impregnó dicha punta con cada una de las sustancias a evaluar correspondientes a la fuente carbonada o nitrogenada en estudio. Se introdujo la punta de la aguja perpendicularmente a la superficie del medio de cultivo, en el sitio previamente asignado y rotulado en el fondo de la placa. Este procedimiento se repitió de manera sucesiva, para cada una de las sustancias a estudiar (Figura 1). Posteriormente, las placas se colocaron invertidas, en una estufa a 35°C. Cada 24 horas se procedió a la lectura de las mismas, hasta un máximo de 7 días, reportándose la asimilación de las sustancias nitrogenadas y carbonadas, al evidenciarse una zona circular de mayor densidad de crecimiento alrededor del sitio donde se aplicó la sustancia a estudiar en el agar. Dicha lectura fue efectuada por un observador ciego (desconocedor del resultado de algún dato de la investigación realizada) [2].

Método estadístico

Se determinaron frecuencias, porcentajes y sensibilidad utilizando estadística descriptiva.

Resultados

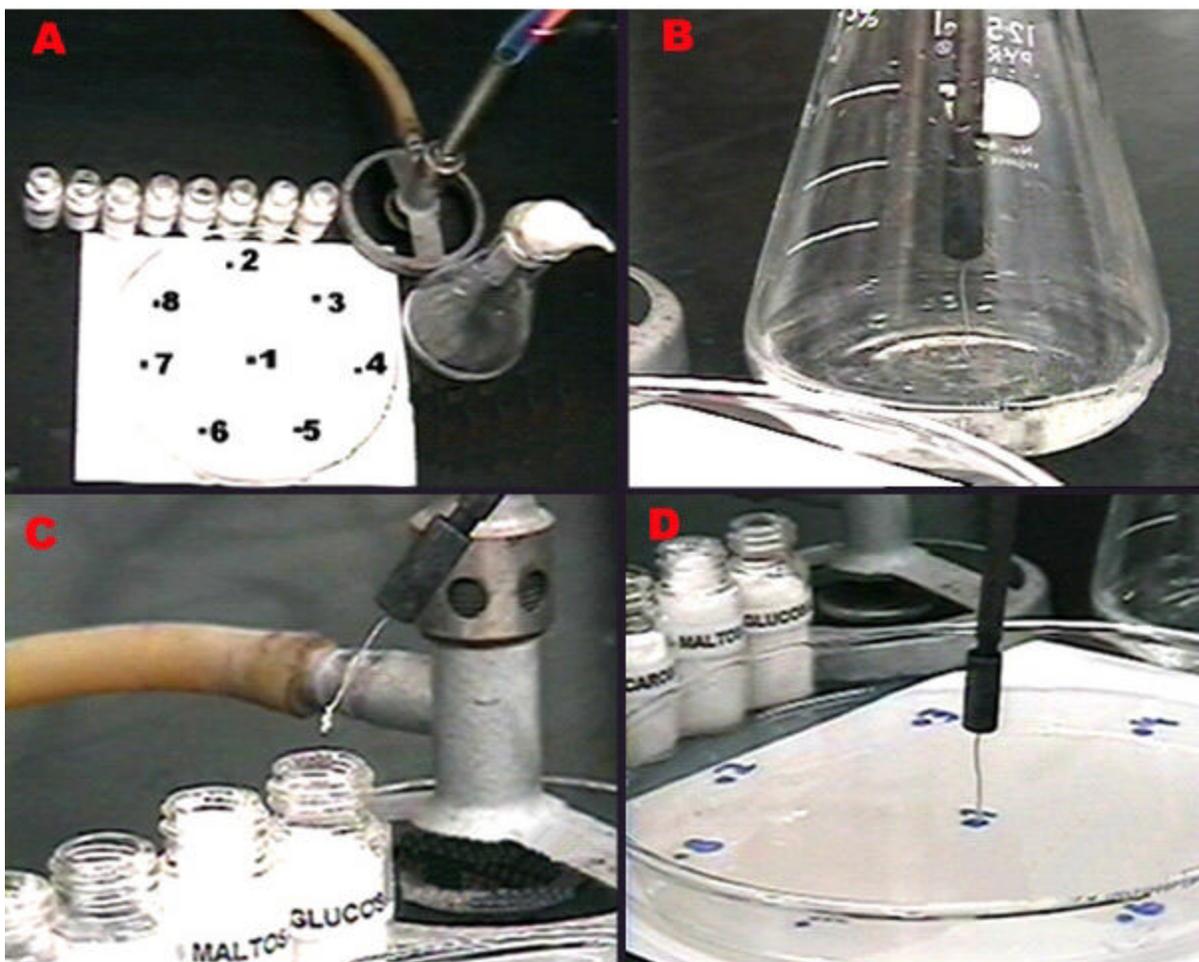
Con respecto a la identificación efectuada a través del aparato automatizado MicroScan® DADE BEHRING, todas las 43 cepas en estudio, resultaron pertenecientes a la especie *C. neoformans*.

En relación a la prueba de la ureasa se observó que el 100% (43) de las cepas de *C. neoformans* evaluadas, resultaron ureasa positiva.

Al aplicar la prueba de auxonograma en medio sólido con la técnica de Araujo, para evaluar la capacidad del microorganismo de utilizar determinadas sustancias como única fuente de carbono, se observó, que un 100% de las cepas (43), asimilaron la maltosa, la sacarosa, el inositol y el galactitol; sólo un 6,97% de las cepas (3),

asimilaron el eritritol. Ninguna de las 43 cepas estudiadas asimiló la lactosa y la melibiosa. Estos resultados se obtuvieron a las 24 horas, permaneciendo sin cambio hasta los 7 días de observación (Tabla 1, Figura 2).

Con respecto a la capacidad de las levaduras de asimilar determinadas sustancias como fuentes nitrogenadas, se encontró que no hubo asimilación de nitrato por parte del 100% de las cepas estudiadas. En contraste, el 100% de estas cepas asimilaron la creatinina, hecho que no se presentó de manera uniforme ya que a las 24 horas solo habían asimilado esta sustancia un 44,19% de las cepas (19); a las 48 horas se reportó la asimilación de un 46,51% (20) y el resto a las 72 horas (Tabla 2, Figura 3).



Al comparar los resultados observados en nuestro estudio con la prueba de auxonograma utilizando el medio de Lodder, aplicado en la técnica de Araujo, se reveló una total concordancia con lo descrito por Lodder y Rippon [37, 41], haciendo posible identificar a todas las cepas estudiadas como *C. neoformans*. Resultados estos que se corroboran con los obtenidos por el método de identificación automatizada

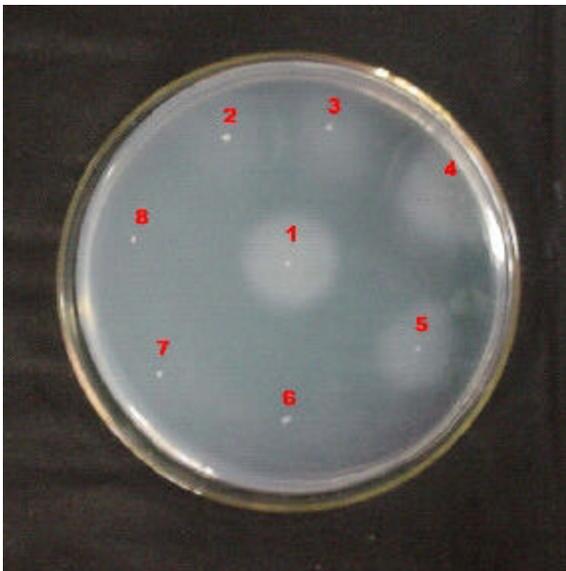
utilizando el MicroScan[®]. Demostrándose así que la técnica de Araujo presenta un 100% de sensibilidad, para la identificación de especie (Tabla 1).

Discusión

Las infecciones por hongos son frecuentes entre los pacientes con algún tipo de inmunosupresión. Aunque *C. albicans* y otras especies del género *Candida* se asociaron con mayor frecuencia a infecciones sistémicas durante años, otros géneros de levaduras como por ejemplo *C. neoformans*, han adquirido gran importancia por su incremento como patógenos oportunistas [4, 7, 15, 29, 31, 35, 40, 52].

C. neoformans es el responsable de la mayoría de los casos de meningitis en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana. El diagnóstico precoz y un tratamiento temprano de la infección, son necesarios para la curación de estos pacientes [4, 7, 15, 17, 29, 31, 33, 35, 36, 40, 46, 49, 52, 53].

[Frame 207](#)



El objetivo fundamental de realizar un adecuado examen micológico es el de lograr el aislamiento e identificación oportuna del hongo a partir de la muestra clínica, con la finalidad de implementar un tratamiento antifúngico y brindar un aporte al estudio epidemiológico de la micosis que produce.

En este sentido, se estudió el comportamiento de las cepas de *Cryptococcus* sp ante diversas pruebas bioquímicas de diferenciación (prueba de la ureasa, auxonograma) con el objetivo de evaluar sus ventajas, en la identificación de especies de este género.

Entre las diversas pruebas bioquímicas efectuadas en el presente trabajo destinadas a la identificación de la especie de *Cryptococcus*, se encuentra la prueba de la ureasa. Para realizar esta prueba se utilizó, el medio de Caldo Urea de Stuart evaluado previamente por nosotros [36] el cual es poco costoso, de fácil elaboración y ha sido ampliamente utilizado en el área de bacteriología [12,19, 43, 45, 50].

Por consiguiente destacamos, que el Caldo Urea de Stuart [36] se puede utilizar como una opción para realizar la prueba de la ureasa en un laboratorio de micología.

Con respecto a la prueba de auxonograma mediante el uso de la técnica de Araujo, para evaluar la capacidad de *C. neoformans* de asimilar las fuentes carbonadas y nitrogenadas, sugeridas por Lodder y Rippon, se observó un comportamiento bioquímico homogéneo en el 100% (43) de las cepas estudiadas. Los resultados obtenidos con la técnica de Araujo concuerdan con lo reportado con los autores anteriormente mencionados, para identificar esta especie de levadura [2, 37, 41, 48]. Igualmente el método de identificación automatizada con el MicroScan® arrojó los mismos resultados.

Las cepas de la micoteca evaluadas, mantuvieron su capacidad de asimilar las sustancias que representan las fuentes de carbono y de nitrógeno, al igual que la capacidad de producir la enzima ureasa, indistintamente al número de años sumergidas en el agua destilada. Por lo tanto el método de conservación de Castellani utilizado por nosotros en la Sección, mantuvo nuestras cepas viables y sin alterar estas propiedades bioquímicas. Aspecto que destaca la utilidad del método como excelente técnica de conservación de esta levadura, con la ventaja de su bajo costo y simple elaboración [9, 18, 21, 42, 44].

Llama la atención que la asimilación de la creatinina como fuente nitrogenada, por parte de las cepas estudiadas, se presentó en un lapso de 24-72 h. Bennett y colaboradores en el año 1982 [5], reportan que no todas las cepas de *C. neoformans* asimilan la creatinina de manera uniforme. Debido a la lenta capacidad de asimilar la creatinina, el serotipo A de *C. neoformans* crece más lento que los otros serotipos, en medios que contienen esta fuente nitrogenada.



[Frame 240](#)

Por último, con la experiencia obtenida al aplicar la técnica de Araujo [2], podemos afirmar que representa una gran ventaja, ya que se obtuvo un ahorro de material y de tiempo, al realizar la misma. El ahorro se evidenció, al lograr evaluar de manera simultánea, 7 sustancias que constituyen las fuentes de carbono y 3 fuentes nitrogenadas. Todos estos aspectos son relevantes en un laboratorio de escasos recursos económicos, especialmente si se maneja una elevada carga de trabajo, lo que contribuye a minimizar los gastos, sin perder la efectividad de la prueba.

Sería interesante en futuros estudios, aplicar esta técnica, a otras especies de levaduras, para evaluar el comportamiento de las mismas. Al igual que compararla, con alguna de las otras técnicas ampliamente utilizadas.

Referencias Bibliográficas

1.

Araujo C. Auxonograma pela técnica de pequenas cavidades, para identificacao de Leveduras. O Hospital. 1964; 66: 29-32.

2.

Araujo C. Diagnóstico de laboratorio de levaduras En: Araujo C. Manual de procedimientos para el diagnóstico etiológico de enfermedades de transmisión sexual. Laboratorio de Enfermedades de Transmision Sexual. Facultad de Farmacia Universidad de Los Andes.1997. Mérida: 12-35.

3.

Arechavala AI, Robles AM, Negroni R, Bianchi MH, Taborda A. Valor de los métodos directos e indirectos de diagnóstico en las micosis sistémicas asociadas al SIDA. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1993; 35: 163-169.

4.

Bava AJ, Robles AM, Negroni R, Arechavala A, Bianchi M. Estudio de algunos aspectos epidemiológicos de 253 casos de criptococosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1997; 14: 111-114.

5.

Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Theodore TS. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* 1978; 16:167.

6.

Borelli D. Examen Micológico. En: Núñez, MJ; Gómez, MJ; Carmona, O. *Microbiología Médica 2a Ed* Editorial Publicaciones UCV, 1997 Caracas: Cap 27: 627 -640.

7.

Botha RJ, Wessels E. Cryptococcal meningitis in an HIV negative patient with systemic sarcoidosis. *Journal Clinical Pathology*. 1999; 52: 928-930.

8.

Bottone EJ, Kirschner PA, Salhin IF. Isolation of highly encapsulated *Cryptococcus neoformans* serotype B from a patient in New York City. *Journal of Clinical Microbiology*. 1986; 23: 186-188.

9.

Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1998; 15: 166-168.

10.

Calvo B, Fischman O, Castelo A, Reís J, Del Bianco R, Barbosa RM, Zaror L. Detección de antígeno del polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA y neurocriptococosis en Sao Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1991; 33: 485-490.

11.

Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, et al. Epidemiology and host and variety -dependent characteristic of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand.

Clinical Infectious Diseases. 2000; 31: 499-508.

12.

Christensen B. Urea Descomposition as a means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from each other and From *Salmonella* and *Shigella* type. Journal Bacteriology. 1946; 52:461-466.

13.

Chuck S, Sande. M. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. The New England Journal of Medicine. 1989; 321: 794-799.

14.

Cruickshank JG, Cavil R, Jelbert M. *Cryptococcus neoformans* of unusual morphology. Applied Microbiology. 1973; 25: 309-312.

15.

Dictar MO, Maiolo E, Alexander B, Jacob N, Verón MT. Mycoses in the transplanted patient. Medical Mycology. 2000; 38(S1): 251-258.

16.

Donadle M, Reviákina V, Maldonado B, Bukonja A. Inmunodiagnóstico de micosis sistémicas en pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana en Venezuela. Boletín Venezolano de Infectología. 1999; 9: 1-4.

17.

17 Dufait R, Velho R, De Vroey C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-Proline assimilation. Mykosen. 1987; 30: 483

18.

Ferreti R, Moraes C. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. Revista Iberoamericana de Micología. 2001; 18: 191-196.

19.

Gómez MJ, Hernández C, Landaeta ME, Montes T, Muñoz F, Pérez C, Uzcátegui Z, Zamora F. Práctica 3: Diagnóstico bacteriológico. En: Guía de Trabajos Prácticos de Microbiología. Editorial Universidad Central de Venezuela, Vicerrectorado Académico, 2000: 43-63 Caracas.

20.

Goodman JS, Kaufman L, Glenn M. Diagnosis of cryptococcal meningitis. The New England Journal of Medicine. 1971; 285: 434-436.

21.

Hartung C, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. Mycopathologia. 1989; 106: 73-79.

22.

Hems EM, Porto E. Métodos micológicos utilizados na rotina de identificação de leveduras do gênero *Candida*. En: Lacaz C. Candidiases. Editora da Universidade de São Paulo, 1970. São Paulo: 55-77.

23.

Hovette P, Soko TO, Raphenon G, Camara P, et al. Cryptococcal meningitis in AIDS patients: an emerging opportunistic infection in Senegal. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1999; 93: 306.

24.

Kwon-Chung KJ, Sorrell TC, Dromer F, Fung E, Levitz SM Cryptococcosis: clinical and biological aspects. Medical Mycology. 2000; 38(S1): 205-213.

25.

Lacaz C, Porto E, Costa JE. Técnicas micológicas e imunológicas. Técnicas de coloração em micopatologia. Meios de cultivo. Manutenção de culturas. Cultivo em lâmina. Preparo de antígenos micóticos. Técnicas micológicas e imunológicas de uso corrente. En: Lacaz C. Micología Médica Savier. 1991. São Paulo: Cap 36: 557-575.

26.

Lacaz C, Porto E, Heins-Vaccari EM, Takahashi N. Identificação dos Fungos. En: Guia para identificação Fungos-Actinomicetos-Algas de interesse médico. Savier, 1998 São Paulo: 94-123.

27.

Langeron M, Guerra P. Nouvelles recherches de zymologie. medicales. Ann Parasit. Humme et Comparée. 1938; 16: 162-179.

28.

Marcano C. Candidiasis y otras micosis. En: Núñez MJ, Gómez MJ, Carmona O. Microbiología

Medica. 2a ed. Editorial Publicaciones UCV, 1997 Caracas; Cap 30:645-663.

29.

Marques SA, Robles AM, Tortorano AM, Tuculet, et al Mycoses associated with AIDS in the third world. *Medical Mycology* 2000; 38(S1): 269-279.

30.

Medoff G, Kobayashi GS. Systemic fungal infections: an overview. *Hospital Practice*. 1991; 15: 41-52.

31.

Merhed JC, García J. Infecciones micóticas en pacientes inmunocomprometidos: Estudio anatomopatológica de. 404 necropsias. *Antibióticos e Infeccion*. 1992, 1: 12-17.

32.

Mickelsen PA, McCarthay LR, Propst MA. Further modifications of the auxanographic method for identification of yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. 1977; 5: 297-301.

33.

Mitchell T, Perfect J. Cryptococcosis in the era of AÍDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8: 515-548.

34.

Negrón R, Cendoya C, Arechavala AI, Robles AM, Bianchi M, Bava AJ, Helou S. Detection of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide antigen in asymptomatic HIV-infected patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 1995; 37: 385-389.

35.

Pappas PG, Perfect JR, Cloud GA, et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clinical Infectious Disease*. 2001; 33: 690-699

36.

Pérez C, Goitia K, Mata S, Hartung C, Colella MT, Reyes H, Hernández C, Villarroel M, Ontiveros J, Magaldi S, Suárez R, utilización del caldo de urea de Stuart para el test de la Ureasa, como prueba en el diagnóstico de las levaduras. 2002; 2: 136-140.

37.

Phaff HJ, Fell JW. *Cryptococcus*. In: Lodder The Yeast North-Holland Publishing Company, 1970. 1a ed, Amsterdam: Chap. 7: 120, 121.

38.

Powderly W. Cryptococcal meningitis and AIDS. *Clinical Infectious Diseases*. 1993; 17: 837-42.

39.

Rhodes JC, Roberts G. Comparison of four methods for determining nitrate utilization by *Cryptococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1975; 1: 9-10.

40.

Ríos A. Infecciones Micóticas en Pacientes con Cáncer. *Antibióticos e Infección*. 1994, 2: 13-22.

41.

Rippon JW. The Pathogenic Fungí. In: Rippon JW. *Medical Mycology*. 3er Ed W.B. Saunders Company, 1988. Philadelphia: Chap 21: 532-558.

42.

Rodriguez E, Lirio V, Lacaz CS. Preservacao de fungos e actinomicetos de interesse médico en agua destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1992; 34: 159-165.

43.

Rustigian R, Stuart S. Decomposition of Urea by *Proteus*. *Biological Medicine*. 1941; 47:108-112.

44.

Salas J. Micoteca: conservación en agua. *Acta Médica Venezolana* 1968; 14: 416-417.

45.

Sánchez P. *Manual de Procedimientos en Bacteriología Clínica: Medios de Cultivo. Reactivos y Colorantes*. 3a ed. Editorial Presencia Ltda., 1992 Colombia Pp: 157.

46.

Seaton RA, Naraqi S, Wembri JP, Warrell DA. Cell-mediated immunity in HIV seronegative patients recovered from *Cryptococcus neoformans* var *gattii* meningitis. *Journal of Medical & Veterinary Mycology*. 1997; 35: 7-11.

47.

Severo LC, Londero AT, Martins SC, Reolon M, Geuer RG. Provavel criptococose Pulmonary causada por *Cryptococcus neoformans* nao-capsulado. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 1981; 23: 283-286.

48.

Sidrim JJC, Moreira JLB. Diagnóstico laboratorial das leveduras. En: Sidrim JJC. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Edit Guanabara Koogan SA. 1999. Rio de Janeiro 76-89.

49.

Staib F. New concepts in the occurrence and identification of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia et Mycologia Applicata. 1963; 19: 143-145.

50.

Stuart C, Stratum E, Rustigian R. Further Studies on Urease Production by Proteus pand related organims. Journal Bacteriology. 1945; 49: 437 -444.

51.

Tanner DC, Weinstein MP, Fedorciw B, lobo KL, Thorpe JJ, Barth L. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. Journal of Clinical Microbiology 1994; 32: 1680-1684.

52.

Tortorano AM, Viviani MA, Rigoni AL, Cogliati M, Roverselli A, Pagano A. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in ItaJy. Mycoses. 1997; 40: 397 -302.

53.

Vilchez RA, Irish W, Lacomis J, Costello P, Fung J, Kusne S. The clinical epidemiology of pulmonary Cryptococosis in non-AIDS patients at a Tertiary Care Medical Center. Medicine. 2001; 80:308-312.

54.

Zerpa R, Huicho L, Guillén A. Modified indian ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens. Journal of Clinical Microbiology. 1996; 34: 2290-2291.