

# LA CRIPTOCOCOSIS: DE ENFERMEDAD ESPORÁDICA A REEMERGENTE

## PARTE II: DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO, DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL, TRATAMIENTO, PRONÓSTICO Y PREVENCIÓN

JORGE ENRIQUE PÉREZ CÁRDENAS

(Profesor asociado. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias para la Salud. Universidad de Caldas)

### RESUMEN

La criptococosis es una de las principales enfermedades micóticas sistémicas que se generan cuando hay un debilitamiento del sistema inmune; la frecuencia de la enfermedad ha aumentando en los últimos años a nivel mundial, paralelamente con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, razón por la cual se considera como una enfermedad marcadora del comienzo del mismo.

En el primer artículo se hizo una revisión de los aspectos relacionados con el hongo, con la epidemiología de la enfermedad y las manifestaciones clínicas que se generan al estar infectado con este hongo.

En esta segunda parte, se hace una descripción de los métodos de laboratorio más utilizados en el diagnóstico de la enfermedad; de las alternativas de tratamiento; de los factores relacionados con el pronóstico de la evolución de la misma y con los aspectos de la prevención, importantes para evitar recaídas o reinfecciones.

### ABSTRACT

The cryptococosis is one of the principal mycotic systemic diseases that appear when the immune

system is weak; the frequency of the disease has risen in the last years in all world, as same time with the Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), reason for which has been considered as a marker of begining of AIDS.

In the first paper was done a revision about the aspects related with the fungus, the epidemiology and the clinic manifestations of the disease.

In this second part, be done a description of the laboratory methods more used in the diagnosis of the disease: the treatment alternatives; the facts related with the prognosis and the aspects of the prevention, very significant to avoid relapses or reinfections.

### Diagnóstico por el laboratorio

#### Examen directo

Se utiliza en la búsqueda de *Cryptococcus* cualquiera de los fluidos corporales, donde el espécimen más frecuente es el líquido cefalorraquídeo, también pueden ser utilizados esputo, fluido pleural, biopsia a campo abierto y el lavado broncoalveolar, este último tiene mayor valor predictivo, por el alto porcentaje de aislamientos de *Cryptococcus*. El aislamiento de *Cryptococcus* de secreciones

respiratorias debe ser interpretado con cuidado porque este hongo se ha encontrado como comensal del tracto respiratorio, principalmente en pacientes con manifestaciones respiratorias crónicas, pero sin inmunosupresión; sin embargo, su identificación, los cambios radiológicos compatibles y la exclusión de otras causas, hacen posible el diagnóstico de la criptococosis en estos pacientes (Meyohas, 1995).

En el examen directo, se observa levaduras esféricas unigemantes y a veces con gemaciones múltiples, con inclusiones citoplásmicas y pared gruesa refringente; para la detección de la cápsula es necesario un colorante que no sea tomado por el hongo y permita observarla, tal como la tinta china diluida 1:5; la nigrosina, también ha sido utilizada, pero tienen menor sensibilidad que la tinta china, aunque esta aumenta cuando se trata la muestra con mercurio cromo al 2% antes de la coloración (Zerpa, 1996); el blanco de calcofluor colorea la pared celular de verde brillante, aunque no es útil en los casos donde haya pocas levaduras (Hageage, 1984). En ocasiones el diámetro de la cápsula puede ser de hasta 20  $\mu\text{m}$ ; se encuentran pseudomicelios o células sin gemación debido a la facilidad con que la célula hija se separa de su célula madre; las levaduras son confundidas con burbujas y leucocitos por personas inexpertas.

En muestras de piel, líquido cefalorraquídeo o sangre fijadas a una placa puede colorearse con Wrigth o Wrigth-Giemsa, coloraciones con las que se observa la levadura, mas no la cápsula, la que se evidencia por la presencia de un espacio entre las mismas.

En cuanto al líquido cefalorraquídeo, este puede presentar además un aumento de proteínas, disminución de la glucosa, celularidad variable con ligero predominio de los mononucleares; las levaduras se detectan en el 50 a 60% de los casos; en los criptococomas, los niveles de proteínas y glucosa usualmente están normales o levemente alterados, así como también en el 50% de los pacientes con SIDA, a diferencia de lo que ocurre

con los pacientes sin SIDA, en los cuales estos niveles si presentan variación (Shaunak, 1989). Al obtener el líquido cefalorraquídeo a veces se evidencia la elevación de la presión intracraneana; este hallazgo es común en las 2/3 partes de los pacientes (Harrison, 1998)

## Biopsias

En los tejidos se sospecha la presencia de *Cryptococcus*, ya sea por el sitio de donde es tomada la muestra o por la observación de blastoconidias compatibles con la coloración de Hematoxilina-eosina; debe hacerse coloraciones especiales tales como la de Mucicarmina de Mayer, donde la cápsula toma un color rojo brillante; el azul de Alcian, la plata metenamina, Fontana Masson y ácido peryodico de Schiff (PAS); con estas dos últimas coloraciones, así como con la hematoxilina y eosina, se tiñe la pared del hongo más no la cápsula, pero sí se observa un espacio entre cada blastoconidia, semejante a un halo que corresponde a la presencia de ésta (Arango, 1995).

La reacción tisular que presentan las lesiones van desde procesos granulomatosos, los cuales se asocian con la presencia de pocas levaduras y necrosis escasa, hasta una reacción mínima con pocos macrófagos esparcidos en el tejido, donde se observan gran cantidad de levaduras a veces sin cápsula o débilmente encapsuladas, las muestra tiene un aspecto gelatinoso (Durden, 1994); a nivel del cerebro, es frecuente encontrar lesiones líticas y en los pulmones lesiones fibróticas

## Cultivo

El hongo crece en medios simples con o sin antibióticos, siempre y cuando no tengan actidiona, sus colonias se observan al cabo de 2 a 10 días, pero para su reconocimiento no basta la presencia de colonias mucoides, brillantes, de color crema, semejantes a leche condensada, sino que es necesario hacer pruebas bioquímicas tales como la ureasa, la

utilización de carbohidratos, como pentosas, hexosas, disacáridos y trisacáridos, la determinación de la enzima nitrato-reductasa, fenol oxidasa y alcohol. El grado de mucosidad presentado por la levadura depende en gran medida de el tamaño de la cápsula; las colonias muy encapsuladas secretan sustancias líquidas que se localizan en el fondo de los tubos o en las tapas de las cajas de petri donde se hizo el cultivo (Mitchell, 1995).

Solamente las variedades de *Cryptococcus neoformans* tienen la capacidad de crecer a 37°C, donde su velocidad de crecimiento es de 2,5 a 6 horas, sin embargo a temperaturas de 39 a 40°C ésta disminuye significativamente, además de que se presenta vacuolización intracelular, patrones de gemación aberrantes y pseudohifas. La variedad *gattii* es más sensible que la variedad *neoformans* puesto que a 40°C mueren en un período de 24 horas.

Para la diferenciación de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* de *Cryptococcus neoformans* var *gattii*, se utilizan varios métodos tales como: el crecimiento en agar azul de bromotimol-canavanina-glicina, medio en el que crece bien la variedad *gattii*, ya que utiliza la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, mientras que la canavanina inhibe el crecimiento de la variedad *neoformans* (Garza, 1995). La asimilación del D-triptofano por parte de la variedad *gattii*, permite diferenciarlo de la variedad *neoformans* (Mukamurangwa, 1995). El uso de la inmunofluorescencia directa puede servir para diferenciar cada una de las variedades de *Cryptococcus*, por la utilización de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el polisacárido capsular, cada uno de los serotipos presenta diferentes patrones de fluorescencia; una tinción brillante homogénea con agregados celulares es característico del serotipo A, muy pocas células del serotipo D presentan este mismo patrón, mientras que en el serotipo C así como el serotipo B la gran mayoría de las células son negativas, aunque algunas células presentan un patrón moteado (Dromer, 1993). Cada cepa también puede ser biotipificada por métodos basados en el

análisis del ADN por medio de RFLP, tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o ADN polimorfo amplificado al azar (RAPD).

Para el crecimiento de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* se utilizan otros medios de cultivo: el Agar de extracto de levadura-glucosa-peptona (YEPG), suplementado con 100µM. de ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) (Varma, 1995), el agar ácido caféico y el agar harina de maíz, donde el hongo produce colonias de color café (Li, 1993). Cuando se va a obtener el *Cryptococcus* de secreciones no estériles se aconseja utilizar medios como el del ácido caféico o el agar Staib para reconocer las colonias correspondientes a *Cryptococcus* por medio de la producción del pigmento.

Para la determinación del estado perfecto de *Cryptococcus*, se utilizan medios como el agar de girasol (Madrenys, 1993), agar salvado de trigo y agar extracto de malta (Hsu, 1994), con incubación entre 20 a 22 °C. por un período de 15 días a un mes.

Al observar al microscopio las células derivadas del cultivo, se observan levaduras con gemación y encapsuladas a veces acompañadas de pseudo-micelio rudimentario o sin él.

El grosor de la cápsula está determinado por la variación genética de la cepa así como también por las condiciones de crecimiento de la misma, la cual puede ser optimizada en medios sólidos o líquidos en presencia de glucosa al 1%, 1 µg de tiamina por mL, 1 mg de glutamato por mL., pH neutro, temperatura de 37°C, dióxido de carbono y elevación o disminución de la concentración de hierro (Granger, 1985; Vartivarian, 1993). El tamaño de la cápsula se disminuye in vitro a temperaturas bajas, en condiciones de alta osmolaridad (16% de glucosa o 2,9% de NaCl), a pH ácido o después de almacenamiento en tierra; la cantidad de cápsula producida por las diferentes cepas varía en las mismas condiciones de crecimiento, lo cual no implica que

desde el punto de vista de la patogenicidad unas van a ser más patógenas que las otras.

El cultivo de líquido cefalorraquídeo, es 85 a 100% sensible en aquellas personas cuyas manifestaciones clínicas se deben *Cryptococcus* (Zerpa, 1996), para mejorar la sensibilidad en su aislamiento de la sangre, se debe utilizar el método de lisis-centrifugación, el cual ha presentado más del 70% de sensibilidad en los pacientes con SIDA (Tarrand, 1991).

El hallazgo de cualquiera de las cepas de *Cryptococcus*, debe ir acompañado de la determinación de la concentración inhibitoria mínima de cada uno de los antimicóticos utilizados en el tratamiento de la criptococosis, con el fin de poder establecer el grado de resistencia o susceptibilidad del hongo a los antimicóticos.

## Inoculación a animales de experimentación

Se utilizan ratones, se les hace inoculación intracerebral; posteriormente se buscan lesiones compatibles con la enfermedad micótica y se hace aislamiento del microorganismo de dichas lesiones. El uso de animales de experimentación está limitado a laboratorios de referencia o de investigación y como método rutinario de diagnóstico no es tan utilizado ya que los métodos alternativos que existen tienen buena sensibilidad y especificidad y menor costo.

## Pruebas inmunológicas

Existen pruebas en las que se detectan anticuerpos y otras en las que se detectan antígenos. Los métodos más utilizados para la detección de anticuerpos son: la Inmunofluorescencia indirecta, la aglutinación en látex, la aglutinación por medio del uso de carbón activado y la aglutinación de levaduras en tubo o placas microtituladoras utilizando una cepa de *Cryptococcus neoformans* productora de cápsula pequeña o moderada; por

medio de estas técnicas se han podido encontrar anticuerpos en el 50 a 80 % de los pacientes; los anticuerpos rara vez se detectan durante la infección activa ya que al haber polisacárido capsular circulante se forman complejos inmunes o puede inhibir su producción por la acción inmunosupresora producida por el glucoroxilomanano sobre la inmunidad humoral

Un método que es utilizado en el pronóstico y seguimiento de los pacientes, es la búsqueda del antígeno, donde se detecta el polisacárido capsular, este es metabolizado lentamente y su título está relacionado con el pronóstico y la respuesta al tratamiento; títulos altos en líquido cefalorraquídeo son de mal pronóstico y títulos en disminución indican buena respuesta al tratamiento y recuperación. El método más utilizado es la aglutinación en látex, aunque también hay métodos inmunoenzimáticos; ambos son altamente sensibles y específicos. Si se comparan tres de los métodos más utilizados para el diagnóstico de la criptococosis: la detección del antígeno tiene aproximadamente un 95% de sensibilidad, mientras que el cultivo un 75% y el examen directo un 50% (De Repentigny, 1992, Nelson, 1990).

La detección del antígeno en suero es útil en pacientes con sintomatología meníngea o pulmonar, pero no es útil en pacientes asintomáticos, sobre todo en zonas donde la prevalencia es baja; el valor predictivo positivo de la prueba en suero es del 92%; títulos del antígeno iguales o mayores a 1:128, sirven para decidir la conducta a seguir con un paciente que presente dolor de cabeza y fiebre; si el título sigue en aumento puede ser necesario hacer la punción lumbar para confirmar el diagnóstico; si el título es bajo o negativo el paciente debe ser manejado de manera conservadora (Harrison, 1998), sin embargo, algunos pacientes con títulos mayores de 1:8 en suero tuvieron invasión pulmonar amplia o diseminación del hongo.

Hay factores que interfieren en la detección del antígeno, uno de ellos es el factor reumatoideo, el cual produce falsos positivos, esto se evita por el uso de pronasa, ditiotreitól o calentamiento con EDTA (Gray, 1988), la reacción cruzada con antígenos de *Trichosporon beigeli* u otros microorganismos es un evento raro (Campbell, 1985, Chanock, 1993); también hay falsos positivos al contaminarse la muestra con fragmentos de agar o agarosa (Heelan, 1991). Los falsos negativos se generan por las siguientes razones: Cantidades pequeñas de antígeno en los líquidos tisulares, presencia de complejos inmunes, reacciones de prozona o infecciones con *Cryptococcus neoformans* no encapsulado o pobremente encapsulado.

### Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de las formas extrapulmonares, se debe hacer con aquellas enfermedades que producen meningitis linfocitarias tales como tuberculosis, sífilis, neurocisticercosis, paracoccidiodomicosis, histoplasmosis, coccidiodomicosis, toxoplasmosis, enfermedades virales, neoplasias, sarcoidosis y abscesos cerebrales.

Por las lesiones radiográficas en forma de moneda en los pulmones, la criptococosis, se confunde con la histoplasmosis o la coccidiodomicosis.

### TRATAMIENTO

Se considera como mandatorio el tratamiento con anfotericina B solo o combinado con otros antimicóticos como fluorocitosina y fluconazol, seguido con un régimen supresivo después del control de la enfermedad ya sea con Anfotericina B, ketoconazol o fluconazol (Grant, 1988).

Se han establecido varios protocolos de tratamiento dentro de los cuales están los siguientes:

2 semanas de inducción con anfotericina B a una dosis de 0,7 mg/Kg/día por vía intravenosa seguido

de fluconazol a una concentración de 200 a 400 mg/día por vía oral, aunque se han reportado tratamientos en los que se utilizan concentraciones de 800 mg/día; dependiendo de la respuesta se puede prolongar el uso de la anfotericina B; la aplicación de la misma se debe hacer mezclada con glucosa al 5% o lípidos en un período de 4 a 6 horas; estos medicamentos se han probado de manera separada encontrándose una rata de éxito para el fluconazol del 34% y del 40% para la anfotericina B, la anfotericina B produce una esterilización más rápida del líquido cefalorraquídeo, posiblemente por que ella se acumula en las membranas meningeas o también por la capacidad inmunomodulatoria que tiene; la mayor frecuencia de recaídas o de progresión de la enfermedad se encontró en los pacientes tratados con fluconazol, así como también la tasa más alta de mortalidad en las dos primeras semanas de tratamiento; la Anfotericina B así mismo se relacionó con mayor toxicidad (Saag, 1992).

Se ha determinado la efectividad de la combinación de Anfotericina B a una dosis de 0,7 mg/kg/día con fluorocitosina a una concentración de 100 mg/kg/día en un período de 14 días; el 59% de las personas presentaron esterilización completa, frente al 50% de las personas tratadas con anfotericina B sola; 79% de los pacientes que utilizaron anfotericina B más fluorocitosina mejoraron o se estabilizaron en su sintomatología frente al 87% de los pacientes con anfotericina B solamente; la rata de mortalidad en ambos grupos fue del 5% (Van Der Horst, 1995, 1997). Se han descrito esquemas alternativos como es el de disminuir la dosis de anfotericina B hasta 0,3 mg/Kg/día con protocolos de tratamiento de hasta 6 semanas o esquemas en los que se utiliza la anfotericina B al doble de su concentración pero en días alternos, sin embargo su efectividad es mayor en aquellas personas que no tienen inmunodeficiencia adquirida.

Cuando se utiliza anfotericina B, es necesario en todos los casos aplicar una dosis de prueba de 1 mg en 300 a 500 mL de dextrosa al 5% en un período

de 4 horas; en caso de no haber anafilaxis la concentración de la misma puede aumentarse rápidamente.

La combinación de fluconazol y fluorocitosina puede ser más efectiva que el fluconazol solo, presentando un 75% de éxito en el tratamiento. Se han utilizado concentraciones de fluconazol de 800 mg/día combinados con fluorocitosina de 150 mg/Kg/día; Jones (1991) encontró que 11 de 15 pacientes se negativizaron en sus cultivos de líquido cefalorraquídeo en un promedio de 21 días. En otros estudios se han hecho ensayos reduciendo la dosis del fluconazol a 400 mg/día y sin administración de drogas antiretrovirales para evitar mayores efectos colaterales sobre la médula ósea producidos por éstas y la fluorocitosina; en este ensayo se encontró que el 63% de los pacientes mejoraron (Larsen, 1994). La combinación de tratamientos puede ser efectiva en pacientes que presentan la enfermedad fulminante (Harrison, 1998).

El itraconazol ha sido otra droga ensayada en la criptococosis utilizando dosis de 400 mg, por vía oral dos veces al día; este tratamiento se comparó con la combinación de anfotericina B y fluorocitosina en concentraciones de 0,3 mg/Kg y 150 mg/Kg/día respectivamente. Se encontró que hubo una respuesta completa en el 41% de las personas tratadas con itraconazol, mientras que el 100% de los tratados con la combinación de anfotericina B y fluorocitosina presentaron una respuesta completa. El itraconazol penetra poco en el líquido cefalorraquídeo, encontrándose una relación líquido cefalorraquídeo: plasma de 0:1 y su efectividad se cree que se produce porque in vitro tiene una concentración inhibitoria mínima menor que el fluconazol y también debido a que es lipofílico acumulándose en los tejidos eliminando de esta manera la presencia del hongo en sitios diferentes al líquido cefalorraquídeo. (Denning, 1989; de Gans, 1988).

La anfotericina B liposomal se ha utilizado siguiendo el siguiente esquema: 1 mg/Kg en el día 1; 2 mg/Kg en el día 2 y 3 mg/Kg en los días siguientes por dos semanas; 14 de 23 pacientes presentaron una respuesta completa después de 11 días de tratamiento, sin embargo se presentaron como efectos adversos la elevación de las transferasas, la creatinina, fiebre, rigor y escalofríos (Lazar, 1991, Schurmann, 1991).

El uso del complejo lipídico de anfotericina B en dosis de 4, 6, 8, 95 o 120 mg/Kg día intravenosa también se ha evaluado y se ha encontrado que 11 de 20 pacientes presentaron una respuesta completa, mientras que en los 9 restantes se aisló *Cryptococcus*, sin producción de manifestaciones clínicas; la gran ventaja de este tratamiento es que los pacientes no presentaron nefrotoxicidad ni cambios hematológicos (Sharkey, 1996).

En pacientes que presenten elevación rápida de la presión intracraneal o neuropatías craneales que demuestren una enfermedad de rápida evolución se sugiere un incremento rápido de anfotericina B, comenzando con una dosis de 1 mg en 20 mL de dextrosa al 5% en un período de 10 a 20 minutos, haciendo monitoreo de los signos vitales por 4 horas; luego de este tiempo si no hay cambios desfavorables en los signos vitales se aplica una dosis de 0,3 mg/Kg en 2 a 6 horas, seguida de dosis de 0,7 mg/Kg/día, mientras que en aquellos que tienen la criptococosis moderada, con un estado clínico más estable, se recomienda la aplicación de la anfotericina B desde los 0,5 a 0,7 mg/Kg/día hasta 5 a 10 mg/Kg/día (Harrison, 1998). Alternativamente, en pacientes con criptococosis meníngea severa, se ha ensayado el uso de la anfotericina B intraventricular cuya aplicación ha producido complicaciones cerebrales, razón por la cual su uso debe ser sopesado en relación con los beneficios que este tratamiento puede traer.

La 5 fluorocitosina se emplea en dosis de 25 mg/Kg, por vía oral suministrada cada 6 horas siempre

y cuando el recuento de neutrófilos sea mayor de  $1000 \times \mu\text{L}$ ; si los niveles de neutrófilos disminuyen por debajo de  $500 \times \mu\text{L}$ , el tratamiento se debe discontinuar. El éxito que este antimicótico ha tenido al ser utilizado solo ha sido moderado debido a la resistencia que el hongo presenta por la alta frecuencia de mutaciones en la vía de la pirimidina; por esta razón el número de recaídas es mayor (30 - 40%) con el uso de este antimicótico; al usarse en combinación con la anfotericina B la frecuencia de recaídas disminuye, además de que se produce un efecto sinérgico por su uso.

Se han hecho ensayos utilizando dosis de 400 mg de fluconazol por día o 200 mg de itraconazol por día encontrándose que al cabo de 10 semanas de tratamiento el 67% y 61% respectivamente de las personas que tomaban cada uno de estos tratamientos presentaron cultivos negativos en el líquido cefalorraquídeo. En otro ensayo en el que se comparó el itraconazol y el fluconazol a una concentración de 200 mg/día, por un período de 52 semanas se encontró que el 3,8% de los pacientes con fluconazol y el 23,6% de los que utilizaron itraconazol presentaron cultivos positivos (Saag, 1995); por otro lado, en un estudio retrospectivo, se encontró que en los pacientes infectados con HIV y con recuentos menores de  $200 \text{ CD4}/\text{mm}^3$  había mayor incidencia de criptococosis visceral en aquellos que no estaban siendo tratados con Fluconazol (8,8 Vs 28,4 casos por 100 pacientes/año), sin embargo los índices de mortalidad no variaron (Manfredi, 1997). El fluconazol no se recomienda en pacientes con un estatus mental pobre, con líquido cefalorraquídeo que tenga menos de 20 leucocitos/ $\mu\text{L}$  y con títulos de antígeno de *Cryptococcus* mayores de 1:1024.

En aquellos pacientes que tienen una presión intracraneal normal y niveles de antígeno de *Cryptococcus* bajos en el líquido cefalorraquídeo puede suministrarse inicialmente 400 mg de fluconazol/día IV, en las primeras semanas, seguido de 200 mg/día.; si el medicamento no es tolerado, puede ser

utilizado itraconazol a concentraciones de 200 mg bid.; por medio de este esquema 10 de 14 pacientes con meningitis criptocococica presentaron una respuesta completa, 3 una respuesta parcial y en 1 falló el tratamiento (Denning, 1991). Otras drogas que se han utilizado en el tratamiento de la criptococosis son: El miconazol, el cual se ha utilizado rara vez e intraventricularmente en la meningitis criptocococica; y el Ketoconazol cuyo uso como tratamiento único, no ha sido exitoso y ha sido desplazado por los nuevos azoles; sin embargo, en pacientes sin inmunocompromiso, y sin criptococosis meníngea, puede ser efectivo (Dismukes, 1983).

El tratamiento contra *Cryptococcus* se considera exitoso cuando no hay evidencia de la presencia o hay disminución del antígeno capsular o negativización de los cultivos, acompañados de mejoría en la sintomatología, sin embargo, en pacientes con títulos mayores de 1:2056 a veces no hay negativización de los títulos; la duración del tratamiento en los pacientes con SIDA no se ha establecido con absoluta certeza debido a que el tratamiento es menos exitoso; algunos investigadores recomiendan una terapia de inducción que puede ser de 2 semanas, seguidas de una terapia de consolidación terminando posteriormente con una terapia de mantenimiento (Van Der Horst, 1997; Powderly, 1996).

Para la terapia de consolidación se recomienda el uso de la misma anfotericina B, el fluconazol o itraconazol en dosis de 400 mg por día por un periodo de 8 semanas (Van Der Horts, 1997). La terapia de mantenimiento es necesaria para evitar las recaídas, las cuales suceden no por una reinfección, sino más bien por reactivación del hongo debido a la localización del mismo en otros órganos, tales como la próstata, donde se ha encontrado *Cryptococcus* en el 20% de los pacientes; el fluconazol a concentraciones de 200 mg/día es más efectivo que la anfotericina B a concentraciones de 1 mg/Kg/día.; en un período de seguimiento de

12 meses, se encontró que el 2% de los que recibían fluconazol, y el 18% de los que recibían anfotericina B recayeron (Sugar, 1988). La probabilidad de muerte, recaída o toxicidad después de un año de seguimiento fue del 39% para el fluconazol y del 56% para la anfotericina B, mientras que la probabilidad de no presentar recaída en un período de un año fue del 97% para el fluconazol y del 78% para la anfotericina B; la toxicidad fue más frecuente en el grupo de la anfotericina B (Powderly, 1992); el itraconazol utilizado solo también se ha ensayado como terapia de sostenimiento encontrándose que es menos efectiva (de Ganz, 1988)

Se ha ensayado el uso de clotrimazol como tratamiento profiláctico y se ha comparado con el fluconazol, encontrándose que el fluconazol es más efectivo en la prevención de las enfermedades micóticas, sin embargo, frente al clotrimazol, el fluconazol no presentó ventajas en la supervivencia de los pacientes (Nightingale, 1992).

El uso de dexametasona a dosis de 0,6 mg/Kg/día en 4 dosis se ha utilizado para disminuir el edema cerebral y el riesgo de herniación, además algunos pacientes pueden requerir punción lumbar diaria con el fin de remover líquido cefalorraquídeo y así controlar el dolor de cabeza y si la presión intracraneana continua se debe considerar la colocación de un reservorio de Ommaya o la implantación de válvulas para el drenaje del líquido cefalorraquídeo; otro medicamento usado es la acetazolamida la cual disminuye la producción de líquido cefalorraquídeo (Harrison, 1998).

Los efectos colaterales de estos tratamientos son una gran limitante en el éxito de los mismos: La anfotericina B es la que mayor toxicidad produce; dentro de los efectos colaterales de la misma se mencionan la nefrotoxicidad, esta aparece cuando se recibe este medicamento por largos períodos de tiempo, en el 80% de los pacientes disminuye la rata de filtración glomerular, efecto que es reversible aun cuando en algunos pacientes el daño es permanen-

te, con pérdida de potasio y magnesio generando una acidosis tubular aguda (Sugar, 1990). Otros síntomas son: anorexia, anemia, hipocalcemia, escalofrío, fiebre, edema pulmonar, flebitis, convulsiones y vómitos; el monitoreo de las células sanguíneas, los electrolitos y la función renal son entonces importantes cuando se utiliza este medicamento. El uso de Ibuprofeno a dosis de 400 mg/día, meperidina en dosis de 15 a 20 mg I.V. combinada con prometacina 25 mg I.V. suministrados antes de la infusión y heparina (1000 U) agregada a la infusión puede reducir algunos de los efectos. El monitoreo de los pacientes a los que se les aplica esta droga debe incluir la creatinina, el potasio, los electrolitos, recuentos sanguíneos 2 a 3 veces cada día. Si hay un aumento de la creatinina por encima de los 300 mg/dL. a pesar de la prehidratación, se debe suspender el tratamiento o cambiarlo por anfotericina B lipídica y si el problema persiste se debe cambiar por anfotericina B liposomal (Harrison, 1998).

Los pacientes a los que se les aplica el complejo lipídico de anfotericina B, tienen una pequeña caída en los niveles de hemoglobina, pero no se eleva significativamente la creatinina (Vincent, 1992), en la forma liposomal, cada vial contiene 900 mg de sucrosa, esto debe ser tenido en cuenta en aquellos pacientes con diabetes

Como efectos colaterales del uso de la fluorocitosina se han mencionado los siguientes: Vómito, náuseas, diarrea, prurito, hepatitis, enterocolitis y disminución en el recuento de granulocitos y plaquetas por toxicidad en la médula ósea (Larsen, 1994). Los efectos colaterales ocurren usualmente cuando los niveles séricos alcanzan valores de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2 horas después del tratamiento; el 30% de las personas que lo utilizan pueden desarrollar resistencia y se debe evitar su uso cuando los valores de los neutrófilos estén por debajo de 500/ $\mu\text{L}$  (Sugar, 1990). Las manifestaciones colaterales por este medicamento son mayores en los pacientes con SIDA y su toxicidad se produce en las dos primeras semanas de tratamiento (Chuck, 1989).



El fluconazol puede producir la elevación de los niveles de fenitoina.

En cuanto a la susceptibilidad a los antimicóticos, se ha encontrado en estudios realizados por De Bedout y Colaboradores (1997) que frente a la anfotericina B, el fluconazol y el itraconazol la gran mayoría de las cepas de *Cryptococcus neoformans* var *neoformas* fueron sensibles a las dosis establecidas, sin embargo, la variedad *gattii*, aunque fue sensible, esta sensibilidad sólo se alcanzó en niveles elevados de cada uno de los antimicóticos. En otro reporte Peetermans (1993), encontró que la variedad *gattii* aislada de un paciente con SIDA fue resistente al tratamiento con Fluconazol, pero sensible a altas concentraciones de anfotericina B; por lo tanto, desde el punto de vista del tratamiento, es importante el reconocimiento de la variedad del hongo para la determinación de la dosis de antimicótico a suministrar. In vitro el itraconazol tiene una concentración inhibitoria mínima menor que el fluconazol, lo cual junto al hecho de ser lipofílico y acumularse en los tejidos puede ser importante en su efectividad; los niveles sanguíneos de este antimicótico disminuyen con el uso concomitante de rifampicina, drogas anticonvulsivantes, antiácidos y bloqueadores de los receptores H<sub>2</sub> (Denning, 1989). Los azoles además, usados de manera persistente pueden inducir resistencia en especies de *Candida*, produciendo de esta manera un aumento en las infecciones en las mucosas o en el esófago. Las pruebas de susceptibilidad in vitro para *Cryptococcus* no son necesarias en los aislamientos iniciales, pero si son importantes después de recaídas, donde si se encuentra un aumento de hasta 4 veces la concentración inhibitoria mínima, se debe hacer un cambio de antimicótico, esto es importante en aquellos pacientes que reciben antimicótico como terapia de soporte para evitar una recaída.

Se ha ensayado el uso de algunas citoquinas tales como el factor estimulante de colonias de los granulocitos y macrófagos (CSF-GM), la interleuquina 2 (IL 2), la interleuquina 12 (IL 12) y

el interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), los cuales de manera directa o indirecta estimulan las células del huésped para inhibir o matar al *Cryptococcus neoformans*. El CSF-GM se ha administrado de manera conjunta con Anfotericina B produciendo una esterilización más rápida del líquido cefalorraquídeo.

## PRONÓSTICO

Durante la terapia 10 a 25% de los pacientes mueren y 30 al 60% pueden presentar recaídas y muerte en un período de 12 meses (Powderly, 1993).

El factor pronóstico más importante es el control de la enfermedad subyacente, en este aspecto las personas con SIDA tienen mejor pronóstico que aquellas con otras enfermedades como neoplasia ya que la rata de supervivencia fue mayor .

Se considera como signos de mal pronóstico:

La presencia de los siguientes síntomas:

Coma, letargia, confusión, defectos en la visión. Ser menor de 35 años de edad.

Tener la prueba de tinta china positiva en líquido cefalorraquídeo.

No tener terapia antiretroviral en los pacientes con SIDA.

Observación de blastoconidias en varios sitios a la vez, lo cual se asocia con diseminación.

Títulos del antígeno mayores de 1:1024 en líquido cefalorraquídeo o suero.

Leucocitos en cantidad menor de  $20 \times \text{mm}^3$  en el líquido cefalorraquídeo.

Hiponatremia.

Presión alta del líquido cefalorraquídeo.

Niveles bajos de glucosa en el líquido cefalorraquídeo.

*Cryptococcus neoformans* aislado de sitios extraneurales

Ausencia de anticuerpos anticryptococcus

Algunos de estos factores colocados por separado no son indicadores absolutos de mal pronóstico, pues se ha encontrado personas que

han respondido bien al tratamiento y mantienen títulos altos de antígeno, aun cuando estas personas tienen un riesgo mayor de presentar recaídas.

El desarrollo de hipertensión diastólica durante el tratamiento se ha asociado con muerte, esta se correlaciona con la hipertensión del líquido cefalorraquídeo (Fan-Havard, 1992).

## Prevención

Debido a la naturaleza oportunista de la enfermedad, no se sugieren medidas de prevención, mas sin embargo, en aquellos pacientes que tienen algún proceso inmunosupresor, se les debe sugerir el no contacto con heces de palomas o la descontaminación de las excretas con antisépticos tales como yodóforos o por el humedecimiento con agua y aceite para evitar la formación de aerosoles. Debido a la asociación entre el Eucaliptus y la variedad *gathii*, se aconseja el no contacto con sitios en los cuales hay la presencia de estos árboles.

Se estudia el uso de una vacuna hecha con el glucoroxilomanano, que es el principal polisacárido de la cápsula de este hongo, el cual unido al toxoide tetánico ha producido buena respuesta en ensayos preliminares (Zhang, 1997). Su utilidad sería mayor si puede inducir inmunidad antes del desarrollo de la inmunosupresión.

Alternativamente se ha propuesto el uso de anticuerpos monoclonales humanizados, los cuales pueden ser utilizado como estrategia de inmunización pasiva para disminuir la cantidad de levaduras y polisacárido capsular presentes en los sitios de infección (Pettoello-Mantovani, 1992).

## INMUNIDAD

La alta prevalencia de *Cryptococcus* en la naturaleza y la baja frecuencia relativa de la Criptococosis implica que muchas personas están expuestas sin

desarrollar los síntomas; los niveles de anticuerpos en la población es variable y depende del grado de exposición, es así como en los criadores de palomas se ha encontrado niveles altos de Inmunoglobulinas G dirigidas contra el hongo.

Las levaduras llegan a los alvéolos y son fagocitadas por macrófagos y granulocitos (Bolaños, 1989), la unión de la levadura al fagocito en la primoinfección no es mediada por opsoninas y aparentemente se debe a uniones receptor ligando que tiene afinidad por la manosa presente en la cápsula; adicionalmente, la cápsula induce la activación de la vía alterna del complemento, con la producción de iC3b, el cual tiene la capacidad de unirse a los tres receptores para el complemento presentes en el macrófago: el CR1, el CR3 y el CR4; los anticuerpos producidos contra *Cryptococcus* no son opsonizantes, además de que la respuesta de anticuerpos es escasa, *Cryptococcus* con cápsulas muy grandes no son fácilmente fagocitados y es necesario la formación de células gigantes multinucleadas que lo ingieran (Levitz, 1998).

Dentro del macrófago el destino del *Cryptococcus* va a depender del tipo de célula que lo ingirió; en el caso de los ratones, los macrófagos peritoneales no inhiben o matan al *Cryptococcus* a menos que esta célula sea estimulada por el interferón  $\gamma$ , activándose de esta manera los mecanismos de destrucción dependientes del óxido nítrico; en contraste los macrófagos broncoalveolares si los destruyen. En el humano, los monocitos tienen buena capacidad destructiva, pero cuando estos se convierten en macrófagos, in vitro, esta capacidad se pierde; así mismo, los macrófagos broncoalveolares no tienen esa capacidad, aunque sí inhiben su crecimiento; además el interferón  $\gamma$ , no sólo falla en aumentar la actividad anticriptocococica del macrófago sino que además puede producir efectos deletereos, esto se debe posiblemente a que los macrófagos humanos no producen una buena cantidad de óxido nítrico cuando son estimulados por *Cryptococcus neoformans* (Levitz, 1998).

A ciencia cierta no se conoce que es lo que destruye al *Cryptococcus* dentro del macrófago pues no es sensible a la acción de los oxidantes ni tampoco a las enzimas producidas en los mecanismos independientes del oxígeno; aparentemente lo único que se ha encontrado que puede dañarlo es el aumento del pH en el fagosoma (Levitz, 1998).

En el proceso de destrucción también participan células asesinas, linfocitos T y mecanismos humorales; aunque los anticuerpos y el complemento no producen un daño directo del organismo, sí permiten que el macrófago junto con la ayuda de los linfocitos T ayudadores y por medio de la producción del CSF-GM, el IFN  $\gamma$ , la IL 2, la IL 12 y la proteína quimiotáctica 1 de los macrófagos (MCP-1) destruya estas levaduras, aun cuando por el estímulo del *Cryptococcus* el macrófago produce algunas de estas citoquinas, también produce interleuquina 10 que regula la acción de los linfocitos T ayudadores

1, del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y de la interleuquina 1b (Levitz, 1998).

La inmunidad celular juega un papel muy importante en el proceso de eliminación de la levadura, lo cual queda demostrado en la alta susceptibilidad de las personas que tienen deficiencias ya sea naturales o inducidas en el sistema fagocítico mononuclear o en los linfocitos T.

En los pacientes infectados con HIV, el macrófago tiene una capacidad reducida de inhibir el crecimiento de *Cryptococcus neoformans*, además la infección del macrófago por parte de *Cryptococcus* induce la acción del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) que produce la traslocación del factor de activación transcripcional kB (NF-kB), el cual activa la transcripción del genoma viral presente en los macrófagos, pudiendo contribuir al empeoramiento del estado de inmunosupresión de la persona (Levitz, 1998).

## BIBLIOGRAFIA

ARANGO, Myrtha; CASTAÑEDA, Elizabeth. Micosis humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, 1995. pp: 105-109.

BOLAÑOS, B., MITCHELL, T.G. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages. J. Med. Vet. Mycol, 1989. 27:203-217.

CAMPBELL, C.K. PAYNE, A.L., TEALL, A.J., BROWNELL, A. et al. Cryptococcal latex antigen test positive in patient with *Trichosporon beigelli* infection. Lancet, 1985. ii:43-44.

CHANOCK, S.J., TOLTZIS, P., and WILSON, C. Cross reactivity between *Stomatococcus mucilaginosus* and latex agglutination for Cryptococcal antigen. Lancet, 1993. 342:1119-1120.

CHUCK, S.L., SANDE, M.A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. N. Eng. J. Med, 1989. 321:794-799.

DE BEDOUT, C., ORDOÑEZ, N., GÓMEZ, B.L., RODRÍGUEZ, M. et al. Sensibilidad a los antimicóticos de aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* y var. *gattii*. Biomédica, 1997; 17(Supl 1):106-107.

DE REPENTYGNY, Louis. Serodiagnosis of Candidiasis, Aspergilosis and Cryptococcosis. Clin. Inf. Dis, 1992. 14 (Supl 1):S11-S22.

de GANS, J; EEFINCK SCHATTENKERK JK; VAN KETEL R.J; Itraconazole as maintenance treatment for cryptococcal meningitis in the acquired immune deficiency syndrome. Br. Med. J. Clin. Res., 1988. 296:339.

DENNING, D.W., ARMSTRONG R.W., FISHMAN, M., and STEVENS, D.A. Endophthalmitis in a patient with disseminated cryptococcosis and AIDS who was treated with itraconazole. *Rev. Infect. Dis.*, 1991. 13:1126-1130.

DENNING DW; TUCKER RM; HANSON LH; et al. Itraconazole therapy for cryptococcal meningitis and cryptococcosis. *Arch Intern Med* 1989; 149:2301-2308.

DENNING DW, ARMSTRONG, RW; LEWIS BH, et al. elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with Cryptococcal meningitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J. Med* , 1991. 91:267-272.

DISMUKES, W.E., CLOUD, G.A., GALLIS, H.A. Treatment of systemic mycoses with Ketoconazole: Emphasis on toxicity and clinical response in 52 patients. *Ann. Intern. Med.*, 1983. 98:13.

DROMER, F; GUEHO, E; RONIN, O; et al. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J. Clin. Microb.* 1993; 31(2):359-363.

DURDEN, Faith. ELEWSKI, Boni. Cutaneous involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1994. 30(5 part 2):844 - 848.

FAN-HAVAR, P., YAMAGUCHI E., SMITH S.M., and ENG, R.H.K. Diastolic hypertension in AIDS patients with cryptococcal meningitis. *Am. J. Med.*, 1992. 93:347-348.

GARZA-GARZA, D; BUENDIA-URIBE, JL; MARTÍNEZ-CRUZ, E; et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev. Latinoam. Microb.* 1995 Jul; 37(3):273-279.

GRANGER, D.L., PERFECT, J.R., DURAK, D.T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*: regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J. Clin Invest*, 1985. 76:508-516.

GRANT, IH; ARMSTRONG, D. Fungal infections in AIDS. *Cryptococcosis. Infectious Diseases clinics of North America*, 1988 Jun; 2(2):457-464.

GRAY, L.D., and ROBERTS, G.D. Experience with the use of pronase to eliminate interference factors in the latex agglutination test for *Cryptococcal* antigen. *J. Clin. Microbiol*, 1988. 26:2450-2451.

HARRISON, Michael J.G.; McARTHUR, Justin C. Cerebral infections in AIDS: *Cryptococcal meningitis. Infect Med.* 1998; 15(6):396-397, 401-407, 409.

HAGEAGE, G.J., HARRINGTON B.J. Use of Calcofluor white in clinical micology. *Lab. Med.*, 1984. 15:109-112.

HEELAN, J.S., CARPUS, L., and KESSIMIAN, N. False positive reactions in the latex agglutination test for *Cryptococcus neoformans* antigen. *J. Clin. Microbiol*, 1991. 29:1260-1261.

HSU, M.M.; CHANG, J.C.; YOKOYAMA, K; et al. Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* isolated in Taiwan. *Mycopathologia* 1994, Feb; 125(2):77-81.

LARSEN, R.A.; BOZZETTE, S.A.; JONES, B.E.; et al. Fluconazole combined with flucytosine for treatment of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Clinical infectious diseases* 1994; 19:741-745.

LAZAR JT, et al. Efficacy and safety of AmBisome (liposomal Amphotericine B) in primary episodes of cryptococcosis in patients with HIV infection VII intl conf AIDS, Florence. 1991; 2:226.

LEVITZ, S.T., Macrophage Interactions with *Cryptococcus neoformans*. ASM News, 1998. 64(12): 693-699.

LI, A; NISHIMURA, K; TAGUCHI, H; et al. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of natural and clinically sourced isolates in China. Mycopathologia 1993, Oct; 124(1):1-5.

MADRENYS; De VROEY, C; RAES-WUYTACK, C, and TORRES-RODRIGUEZ, J.M. Identification of the perfect state of *Cryptococcus neoformans* from 195 clinical isolates including 84 from AIDS patients. Mycopathologia; 1993. 123(2):65-68.

MANFREDI R, MASTROIANNI A, CORONADO OV, et al. Fluconazole as prophylaxis against fungal infection in patients with advanced HIV infection. Arch Intern Med, 1997: 157:64-69.

MEYOHAS, M.C.; ROUX, P; BOLLENS, D, et al. Pulmonary cryptococcosis: Localized and disseminated infections in 27 patients with AIDS. Clin. Infect. Dis. 1995; 21:628-633.

MITCHELL DH, SORRELL TC, ALLWORTH AM, et al. Cryptococcal diseases of the CNS in immunocompetent hosts: Influence of Cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. Clin Infect Dis, 1995: 55:611-616.

MITCHELL, T.G., PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin. Microbiol. Rev, 1995. 8(4):515-548.

MUKAMURANGWA, P; RAES-WUYTACK, C; De VROEY, C. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* can be separated from var *neoformans* by its ability to assimilate D-tryptophan. J. Med. Vet. Mycol 1995, Nov; 33(6):419-420.

NELSON MR, BOWER M, SMITH D, et al. The value of serum cryptococcal antigen in the diagnosis of cryptococcal infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. J. Infect 1990; 21:175-181.

NIGHTINGALE, S et al. Primary prophylaxis with fluconazole against systemic fungal infections in HIV-positive patients. AIDS 1992; 6:191-194.

PEETERMANS, W; BOBBAERS, H; VERHAEGEN, J; Et al. Fluconazole resistant *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in an AIDS patient. Acta Clin. Belg. 1993; 48(6):405-409.

PETTOELLO-MANTOVANI, M., CASADEVALL, A., KOLLMANN, T.R., RUBINSTEIN, A. et al. Enhancement of HIV-1 infection by the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*. Lancet, 1992. 339:21-23.

POWDERLY, W.G.; SAAG, M.S; CLOUD, G.A; et al. A controlled trial of fluconazole or amphotericin B to prevent relapse cryptococcal meningitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. New England Journal of Medicine, 1992; 326(12):793-798.

POWDERLY, W.G. Cryptococcal meningitis and AIDS. Clin. Infec. Dis., 1993. 17:837-842.

POWDERLY, W.G.; recent advances in the management of Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. Clin. infect. Dis. 1996; 22(Suppl 2):S119-S123.

SAAG, M.S; POWDERLY, W.G.; CLOUD, G.A; ROBINSON, P. et al. (NAID Mycoses study Group and the AIDS clinical Trials group). Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis. New England Journal of Medicine 1992; 326(2):83-89.

\_\_\_\_\_ ; VAN DER HORST, C; CLOUD, G , et al. Randomized double blind comparison of Amphotericin B plus Flucytosine (AMB-FC) to AMB alone (STEP 1) followed by a comparison of fluconazole to itraconazole (STEP 2) in the treatment of acute Cryptococcal Meningitis in patients with AIDS. AIDS information newsletter-Cryptococcosis, Oportunistic infections. 1995; 126( part 12): 8-9.

\_\_\_\_\_ ; CLOUD, G.C.; GRAYBILL, S.J.; et al. Comparison of fluconazole (FLU) Versus Itraconazole (ITRA) as Maintenance Therapy of AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis (CM). AIDS information newsletter-Cryptococcosis, Oportunistic infections. 1995; 126( part 12): 8-9.

SHARKEY, P.K.; GRAYBILL, J.R.; JOHNSON, E.S.; et al. Amphotericin B lipid complex compared with amphotericin B in the treatment of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. Clin. infect. Dis. 1996; 22: 315-321.

SCHURMANN D; et al. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B in treating AIDS-associated disseminated cryptococcosis. Journal of infectious diseases 1991 164: 620 - 622.

SHAUNAK S, SCHELL WA, PERFECT JR. Cryptococcal meningitis with normal cerebrospinal fluid. J. Infect Dis. 1989; 160:912.

SUGAR AM, SAUNDERS C: Oral fluconazole as suppressive therapy of disseminated cryptococcosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. MED, 1988: 85;481-489.

SUGAR AM, STERN JJ, DUPONT B. Treatment of cryptococcal meningitis. Rev Infect Dis 1990; 12(Suppl 3):S338-S348.

TARRAND, J.J., GUILLOT, C., WENGLAR, M., JACKSO, J. et al. Clinical comparison of resin-containing BACTEC 26 Plus and the isolator 10 blood culturing systems. J. Clin. Microbiol., 1991. 29:2245-2249.

VAN DER HORST, C; CLOUD, G; et al. Randomized double blind comparison of Amphotericin B plus Flucytosine (AMB-FC) to AMB alone (STEP 1) followed by a comparison of fluconazole to itraconazole (STEP 2) in the treatment of acute Cryptococcal Meningitis in patients with AIDS. AIDS information newsletter-Cryptococcosis, Oportunistic infections. 1995; 126( part 12): 8-9.

\_\_\_\_\_ ; SAAG, M.S.; CLOUD, G.A.; et al. Treatment of Cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 1997: 333:15-21.

VARMA, A; SWINNE, D. STAIB, F; et al. Diversity of fingerprints in Cryptococcus neoformans. J.Clin. Microb. 1995, Jul; 33(7):1807-1814.

VARTIVARIAN, S.E., ANAISSIE, E.J., COWART, R.E., SPRIGG, H.A., et al. Regulation of Cryptococcal capsular polysaccharide by iron. J. Infect Dis, 1993. 167:186-190.

VINCENT M, WEBSTER MH, PETHER JV: Liposomal amphotericin B. Lancet 1992; 339:374-375.

ZERPA R, HUICHO L, GUILLEN A: Modified India ink preparation for C. neoformans in cerebrospinal fluid specimens. J. clin. microb 1996; 34:2290-2291.

ZHANG H, ZHONG, Z, PIROFSKI, L-A: Peptide epitopes recognised by a human anticryptococcal glucuronoxylomannan antibody. Infect Immun, 1997: 65:1158-1164.

ZLUPKO, G.M., FOCHLER, F.J., GALDSCHMIDT, Z.H. Pulmonary cryptococcosis presenting with multiple pulmonary nodules. Chest, 1980. 77:575.