

Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia

Elizabeth Quintero¹, Elizabeth Castañeda² y Alejandro Ruiz¹

¹Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Puerto Rico y ²Grupo de Micología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

Resumen

Cryptococcus neoformans es un patógeno oportunista que afecta tanto a pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes. La epidemia de sida ha señalado la importancia que tiene el estudio de la ecología y epidemiología del hongo. El propósito de este trabajo fue determinar si en Colombia existía relación entre la distribución ambiental de las diferentes variedades de *C. neoformans* y los pisos térmicos en dos transectos ubicados en el departamento de Cundinamarca. Para el aislamiento e identificación de la levadura se usaron métodos fenotípicos convencionales, determinando también la densidad poblacional (unidades formadoras de colonias por gramo de muestra) y la variedad. Se recolectaron un total de 765 muestras, provenientes de 26 municipios; de éstas, 146 correspondían a excrementos de paloma (*Columba livia*), 437 a detritos de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis* y especies afines) y 182 a detritos de almendros de la India (*Terminalia cattapa*). Se aisló *C. neoformans* del 46% de los municipios estudiados, en los dos transectos y en los pisos térmicos cálido, templado y frío. El 88% de los aislamientos se obtuvieron en este último piso. No se encontraron muestras positivas en el piso térmico de páramo. La densidad poblacional en excrementos de paloma osciló entre 50 y $9,2 \times 10^6$, en eucaliptos entre 50 y 1×10^7 y en almendros fue 50 UFC/g. De los 104 aislamientos 31% fueron serotipo A, 59% serotipo B y 10% serotipo C. El 96% de los aislamientos crecieron a 37 °C y todos mostraron cápsula. En conclusión, *C. neoformans* se recuperó en tres de los cuatro pisos térmicos estudiados, con predilección por el piso térmico frío que presenta temperaturas entre 12 y 18 °C y alturas sobre el nivel del mar entre 2.000 y 3.000 m. Las densidades poblacionales no permitieron definir un patrón estándar de ocurrencia.

Palabras clave

Cryptococcus neoformans, Pisos térmicos, Densidad poblacional

Dirección para correspondencia:

Dra. Elizabeth Quintero
Urbanización Villa Guadalupe Calle 18 AA2
Caguas, Puerto Rico 00725
Tel.: +1 787 4642392
Correo electrónico: elizaquinte@hotmail.com

Aceptado para publicación el 11 de abril de 2005

Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* in the department of Cundinamarca-Colombia

Summary *Cryptococcus neoformans* is an opportunistic fungal pathogen that could cause infection in patients with immunodeficiency and healthy patients. The AIDS epidemic has shown the importance of studying the ecology and epidemiology of this fungus. The aim of this investigation was to determine if there was a relationship between the environmental distribution of the different varieties of *C. neoformans* and the thermal floors in two transects located in department of Cundinamarca, in Colombia. For the isolation and identification of the yeast, conventional phenotypic methods were used and it was determined the population density (CFU/g of sample) and which was the variety of greater prevalence in each altitudinal rank. A total of 765 samples, from 26 municipalities were collected; of these 146 corresponded to pigeon droppings (*Columba livia*), 437 to eucalyptus detritus (*Eucalyptus camaldulensis* and related species) and 182 to detritus of almond trees (*Terminalia cattapa*). *C. neoformans* was isolated from 46% of the studied municipalities, in both transects and the thermal floor: warm, temperate and cold. The results indicated that the greater frequency of positive isolations came from the last thermal floor. The population density in pigeon excrements oscillated between 50 and 9.2×10^6 , in eucalyptus between 50 and 1×10^7 and almonds was 50 CFU/g. Of 104 positive isolations 31% were serotype A, 59% serotype B and 10% serotype C; 96% of the isolates grew to 37 °C and all showed capsule. In conclusion, *C. neoformans* prevails in the three habitats studied but it showed a predilection for the cold thermal floor; the population densities did not allow defining a standard pattern of occurrence.

Key words *Cryptococcus neoformans*, Thermal floors, Population density

La criptococosis es una micosis oportunista causada por la levadura *Cryptococcus neoformans* y el curso de la enfermedad depende de las condiciones inmunológicas del paciente [20]. La cápsula es una característica distintiva de la levadura, constituye el principal factor de virulencia y le confiere al organismo diferencias antigénicas que permiten clasificar a los aislamientos en tres variedades (*grubii*, *gattii* y *neoformans*) y cinco serotipos (A, B, C, D y AD) [3]. Las variedades presentan diferencias en la distribución geográfica y en el hábitat. La variedad *grubii* tiene distribución mundial y predilección por suelos contaminados con excrementos de aves, especialmente de palomas (*Columba livia*) [10,11,16]. La variedad *gattii* estaba limitada a regiones templadas, tropicales y subtropicales; no obstante, aislamientos encontrados en Vancouver hacen prever la capacidad de adaptación de la variedad a otras latitudes [W. Meyer, comunicación personal]. El hábitat de la variedad *gattii* se asocia con diferentes especies de *Eucalyptus* [7-9,21] y con otros árboles como almendros [4]. Investigaciones previas han establecido una posible relación entre la infección humana y la exposición a ambientes donde se ha demostrado la presencia de la levadura [18]. Por esta razón, es interesante determinar el hábitat del hongo, los factores abióticos que lo afectan y las relaciones ecológicas que establece en su ambiente natural.

El propósito de esta investigación fue determinar si existía relación entre la distribución ambiental de las diferentes variedades de *C. neoformans* y los rangos altitudinales correspondientes a los cuatro pisos térmicos (cálido, templado, frío y de páramo) existentes en dos transectos ubicados en el departamento de Cundinamarca (Colombia). Adicionalmente, se determinó la densidad poblacional del organismo y la variedad de mayor prevalencia en cada piso térmico.

Materiales y métodos

Área de estudio. El departamento de Cundinamarca en Colombia está situado en la región central del país, entre los 3° 42' y 5° 51' de latitud norte y los 73° 03' y 74° 54' de longitud al oeste del meridiano de Greenwich. Está conformado por 116 municipios, tiene un área de 24.210 Km² de extensión y goza de una posición favorable dentro de la región andina porque cuenta con todos los pisos térmicos. El piso térmico cálido con temperatura superior o igual a 24 °C se extiende altitudinalmente desde los 300 hasta los 1.000 m; el piso térmico templado presenta temperaturas entre 18 y 24 °C y rangos de altura que están entre los 1.000 y los 2.000 m. En Cundinamarca, el piso térmico predominante es el frío con temperaturas entre 12 y 18 °C y alturas sobre el nivel del mar entre los 2.000 y 3.000 m. En el páramo se registran temperaturas iguales o menores a 12 °C y presenta alturas por encima de los 3.000 m.

Se muestrearon dos zonas que se ubicaron en la región sur-occidental y nor-occidental del departamento (Figura 1). En cada sitio se midieron los factores ambientales temperatura, presión atmosférica, altura sobre el nivel del mar y humedad.

Recolección y procesamiento de muestras. En la tabla 1, se especifican las localidades que fueron estudiadas, su distribución por transecto y por piso térmico. En este estudio se exploraron tres tipos de reservorios y de las 765 muestras procesadas 437 correspondieron a detritos de eucaliptos, 182 a detritos de almendros y 146 a excrementos de paloma. Las muestras se recolectaron en bolsas plásticas, se rotularon y se transportaron al laboratorio. Para procesarlas se tomaron 5 g, se resuspendieron en 25 ml de PBS (pH 7,2), se filtraron a través de una gasa estéril y al extracto se adicionó una solución de antibióticos [23].



Figura 1. Mapa del departamento de Cundinamarca ubicando las zonas de estudio.

Tabla 1. Localidades estudiadas, distribución por transecto y por piso térmico.

	Transecto 1	Transecto 2
Piso térmico	Región sur-occidental	Región nor-occidental
Cálido	Anapoima Apulo Viotá La Mesa El Triunfo	Villeta
Templado	El Colegio Tena Santanderico	Sasaíma Choachí
Frío	Usme Granada Sibaté El Salto	Albán Facatativá Madrid Mosquera Cogua Zipaquirá Bogotá La Calera
Páramo	La Regadera	Cruz Verde Páramo Alto

A partir del extracto, se tomaron 100 µl, se inocularon en placas con agar de *Guizotia abyssinica* adicionado con bifenil al 0,1% y se incubaron a 27 °C por un periodo de 10 días con observación diaria a partir del tercer día de incubación.

Identificación. Los posibles aislamientos de *Cryptococcus* se identificaron por la producción de fenoloxidas y se observaron microscópicamente las levaduras capsuladas con el empleo de tinta china.

Evaluación de las características fenotípicas. Los aislamientos se sembraron en agar glucosado de Sabouraud y se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: producción de ureasa, ausencia de nitrato-reductasa y asimilación de carbohidratos (lactosa, melibiosa e inositol) [1]. La variedad se determinó en el agar canavanina glicina azul de bromotimol (CGB) [17] y los serotipos con antiseros específicos elaborados en el Instituto Nacional de

Salud. Los aislamientos serotipos B y C fueron confirmados con el estuche Crypto – Check (Iatron Laboratories, Tokio, Japón) [15]. Con una lente ocular micrométrica y un micropreparado de la levadura en tinta china, se midieron las dimensiones microscópicas de 2.080 levaduras, 20 por cada aislamiento obteniéndose un promedio del tamaño celular y capsular. Macroscópicamente, se tomaron las dimensiones de 20 colonias de cada aislamiento después de cinco días de incubación. Se verificó el crecimiento a 37 °C.

Resultados

Los resultados indicaron que *C. neoformans* estuvo presente en 12 (46%) de los municipios estudiados. En la figura 2 se especifican las localidades en las que se registró crecimiento y los porcentajes parciales de recuperación que resultaron de analizar cada municipio como una muestra independiente.

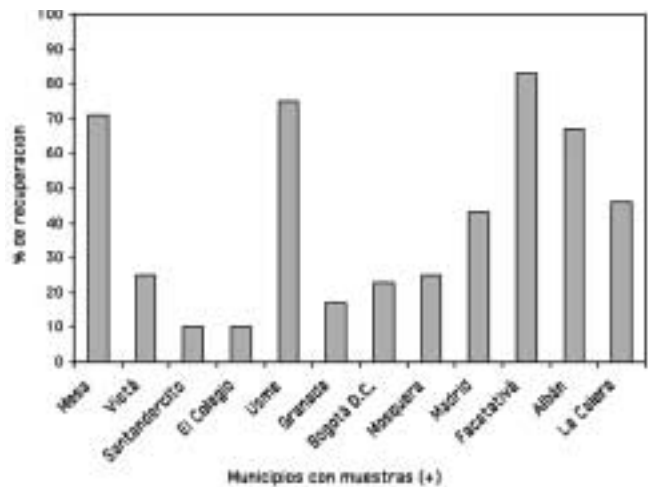


Figura 2. Porcentajes parciales de recuperación de *Cryptococcus neoformans* en las localidades reportadas como positivas.

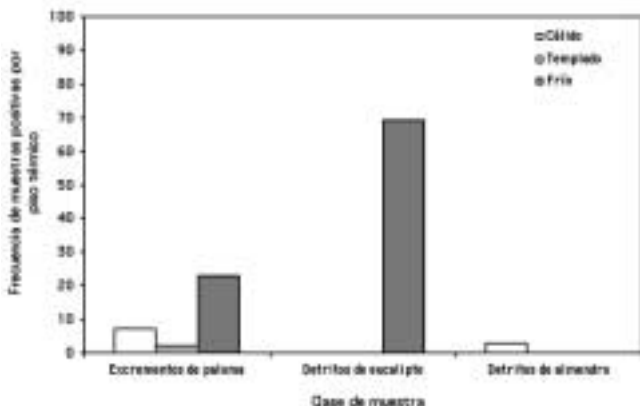
En la tabla 2 se ofrece un resumen del tamaño total de la muestra teniendo en cuenta la fuente de aislamiento y el piso térmico. En la tabla 3 se indica que 104 (14%) muestras fueron positivas y los excrementos de paloma (21%) fueron los sustratos en donde con mayor frecuencia se aisló la levadura. En la figura 3 se establece que 92 de los aislamientos (88%) fueron recuperados en el piso térmico frío, evidenciando la preferencia de *C. neoformans* por ese rango altitudinal. En el piso térmico de páramo, no se aisló la levadura.

Tabla 2. Distribución de muestras procesadas por clase y por piso térmico.

Piso térmico	Muestras			Totales
	Excrementos	Detritos de almendros	Detritos de eucaliptos	
Cálido	14	114	5	133
Templado	25	68	81	174
Frío	107	0	214	321
Páramo	0	0	137	137
Total	146	182	437	765

Tabla 3. Porcentaje de recuperación de *Cryptococcus neoformans* en relación con la cantidad total de muestras procesadas por clase.

Muestra	N	Positivos	%
Excrementos de paloma	146	31	21
Detritos de eucaliptos	437	70	16
Detritos de almendros	182	3	1
Total	765	104	14

**Figura 3.** Muestras positivas de *Cryptococcus neoformans* en relación con la clase de muestra y el piso térmico.

En la figura 4 se relaciona la variable serotipo con el rango altitudinal; al respecto, se determinó que el serotipo A, estaba presente en los tres pisos térmicos de los cuales se aisló la levadura; el serotipo B se aisló exclusivamente en el piso térmico frío y el C se aisló tanto en regiones frías como cálidas. En la tabla 4 se especifica que el serotipo aislado con mayor frecuencia fue el B (59%). Tradicionalmente se han relacionado los serotipos con una clase especial de reservorio; no obstante, en este estudio, se lograron recuperar los serotipos A, B y C a partir de una misma clase de muestra (eucaliptos).

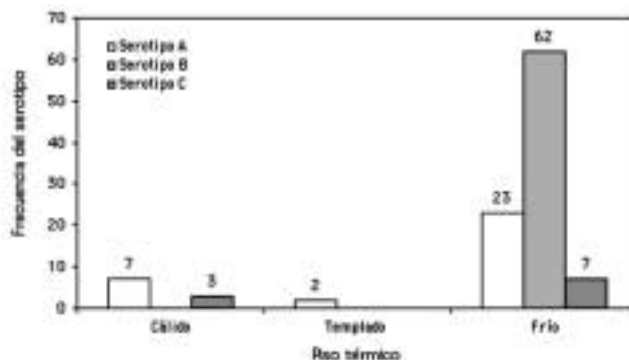
La densidad poblacional no presentó un patrón estándar de ocurrencia: en los excrementos de paloma los valores oscilaron entre 50 y $9,2 \times 10^6$ UFC/g; en los detritos de eucaliptos estuvo entre 50 y 1×10^7 UFC/g y en los detritos de almendros la densidad fue de 50 UFC/g. Al vincular los promedios de las densidades poblacionales obtenidas en cada reservorio y relacionarlos con los pisos térmicos, se determinó que la mayor densidad poblacional del organismo se registró en el piso térmico frío y se obtuvo al procesar las muestras de detritos de eucaliptos ($1,4 \times 10^7$ UFC/g). Las densidades poblacionales más altas se registraron en La Calera ($1,2 \times 10^7$ UFC/g) y en Facatativa ($2,2 \times 10^7$ UFC/g). Ambas localidades ubicadas en el piso térmico frío con temperaturas entre 10 y 12 °C.

Respecto a los factores ambientales y su incidencia en el proceso de recuperación de la levadura, un análisis de regresión múltiple (R^2) mostró que la altitud era una variable de alto significado ($R^2 = 79,8$) y como la temperatura y la humedad dependen de ella, se realizó una correlación simple, escogiendo como variables la densidad poblacional y la altitud. Como se observa en la figura 5, la correlación calculada fue del 40,6%, el intervalo de confianza para estos resultados fue del 95%.

Respecto a la textura, aspecto y tamaño de las colonias, se especificó que las 21 cepas de la var. *grubii* formaron colonias no mucosas, de superficie y borde liso, en tanto que los aislamientos de la variedad *gattii* (83 cepas) presentaron el mismo aspecto pero diferente textura, sien-

Tabla 4. Relación entre el tipo de muestra y el porcentaje de serotipos recuperados.

Muestra	Serotipo	N (%)
Excrementos de paloma	A	31 (30)
Detritos de eucaliptos	A	1 (1)
	B	62 (59)
	C	7 (7)
Detritos de almendros	C	3 (3)
Total		104 (100)

**Figura 4.** Distribución de los serotipos de *Cryptococcus neoformans* por piso térmico.

do estas últimas bastante mucosas. En cuanto al tamaño promedio de las colonias un ANOVA mostró que no había diferencias entre las dos variedades ($p = 0,15$).

Microscópicamente se analizaron dos aspectos: el tamaño de la conidia y el tamaño de la cápsula. Las levaduras pertenecientes a la variedad *grubii* tenían un diámetro celular menor. No obstante, el ANOVA mostró que no había diferencias significativas entre los aislamientos de las dos variedades encontradas ($p = 0,32$) y, los diámetros promedios superaron el límite de infectividad ($> 4\mu\text{m}$). En cuanto al tamaño capsular, este factor resultó dependiente de la variedad ($p = 1 \times 10^{-7}$), el serotipo ($p = 5,06 \times 10^{-10}$) y el tipo de muestra a partir de la cual se aisló el organismo ($p = 2,83 \times 10^{-10}$).

Todos los aislamientos recuperados respondieron al perfil bioquímico asignado para *C. neoformans*. Los aislamientos correspondientes a la variedad *gattii* (serotipos B y C) crecieron en agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) y cambiaron el medio de verde a azul. Se verificó el crecimiento a 37 °C, comprobándose que el 96% de los aislamientos cumplían con esta característica básica de virulencia.

Discusión

La diversidad topográfica, natural y climatológica del departamento de Cundinamarca fueron factores que influyeron positivamente en el proceso de recuperación de la levadura permitiendo recuperar el hongo en el 46% de las localidades estudiadas.

El 88% de los aislamientos fueron recuperados en el piso térmico frío, indicando que las condiciones ambientales relacionadas con precipitaciones y humedad relativa altas, pocas horas de brillo solar, y temperaturas poco extremas, pero en promedio altas, favorecen la ocurrencia y propagación del hongo en el ambiente (Granados y Castañeda, Microbial Ecology, aceptado para publicación, 2004). Este porcentaje de recuperación es similar al des-

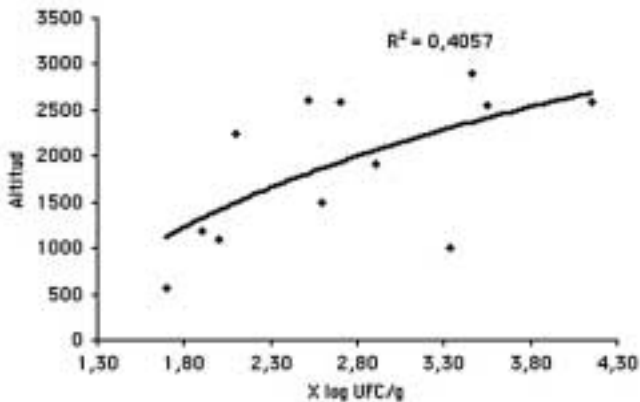


Figura 5. Análisis de regresión simple entre las variables densidad poblacional y altitud.

crito en investigaciones realizadas en Australia donde se estableció que la levadura puede ser aislada a partir de detritos de eucaliptos y de excrementos de palomas durante todo el año, pero con especial interés en temporadas frías [22]. En el piso térmico de páramo no fue posible registrar aislamientos, probablemente porque las condiciones climatológicas en este piso resultan adversas para el crecimiento de la levadura. Sin embargo, la relación entre el piso térmico y la presencia de la levadura no está del todo esclarecida y las observaciones efectuadas en esta investigación están sujetas a una mayor exploración de tipo experimental.

Respecto a los reservorios, *C. neoformans* se recuperó con mayor frecuencia en excrementos de paloma porque este sustrato posee altos niveles de xantina, urea, ácido úrico y creatinina, compuestos que estimulan el crecimiento del hongo y por ser sustancias de origen animal no están presentes en las muestras vegetales [2]. En sustratos de tipo vegetal *C. neoformans* puede subsistir y desarrollarse gracias a que la materia orgánica en descomposición le provee de los requisitos nutricionales básicos, así como de un hábitat. Además, la enzima lacasa asegura la supervivencia de la levadura en estos lugares. En este estudio se aisló *C. neoformans* de detritos de eucaliptos y de almendros y, aunque no se hizo un estudio taxonómico de las especies de eucaliptos muestreadas se observó que la levadura presentaba una asociación con los eucaliptos en general y no con una especie en particular [19].

La densidad promedio de la levadura fue de $5,8 \times 10^5$ UFC/g de muestra; este valor es inferior al más alto de origen ambiental publicado hasta la fecha, 50×10^8 [7]. Se han descrito recuentos similares y aún mayores en otros estudios en los que la densidad poblacional es una variable relacionada con el tipo de reservorio. Los resultados de esta investigación sugieren que al analizar las fuentes de tipo vegetal es más probable encontrar altas densidades del hongo en árboles con materia en descomposición (como fue el caso de los eucaliptos) que en lugares con escasa cantidad de detritos (como ocurre con los árboles de almendro). En un estudio reciente se determinó que el eucalipto no es el hábitat primario para *C. neoformans* var. *gattii* pero la presencia de materia orgánica en descomposición (especialmente madera) en el suelo o en las oquedades de estos árboles proporciona el sustrato favorable para la propagación extensa y clonal de las levaduras [14].

Respecto a los factores ambientales, una correlación del 40,6%, indica que un porcentaje igual de datos obtenidos se explican por la vinculación de las variables densidad poblacional y altitud. La curva obtenida fue de forma logarítmica con asíntota superior tendiendo a estabilizarse. Si se extrapolan los resultados se espera que en alturas por encima de los 3.000 m las densidades sean cada vez menores, resultados que son congruentes con lo encontrado experimentalmente. Los datos indican que altitudes entre 2.000 y 3.000 m pueden constituir un factor de selección importante para la levadura. Como dicho rango altitudinal presenta temperaturas entre 12 y 18 °C se podría pensar que estas temperaturas son ambientalmente óptimas para aislar *C. neoformans* en la naturaleza.

La distribución de *C. neoformans* por serotipo indica que los serotipos de mayor frecuencia son el B (61%) y el A (31%). Estos datos contrastan con estudios previos en los que se indica que el serotipo A es el de mayor distribución a escala universal y el de más fácil recuperación a partir de muestras ambientales [4,7,10]. Por su parte, el serotipo B es la primera vez que se recupera del ambiente en Colombia. Hasta la fecha, sólo se había descrito su presencia en el medio ambiente en Australia, México, Canadá y Brasil [21].

La morfología macroscópica de las colonias de *C. neoformans* está relacionada con la virulencia del hongo en modelos animales; las colonias con morfología mucosa o rugosas son más virulentas que aquéllas con morfología lisa [12]. En esta investigación se determinó que 83 de los aislamientos presentaban una morfología que podía asociarse con “alta virulencia”. No obstante, se debe recordar que la virulencia no depende de una sola característica y, por el contrario, es la expresión de un número crítico de factores que operan en conjunto [6].

Un tamaño microscópico menor de 4 µm en *C. neoformans* se considera infectivo: partículas de estos diámetros alcanzan los alvéolos pulmonares y pueden iniciar el ciclo infectivo. En esta investigación los tamaños capsulares fueron considerados como poco infectivos.

La habilidad para sintetizar melanina a partir de componentes difenólicos se considera un marcador fenotípico que diferencia *C. neoformans* de otras levaduras [24]. A nivel molecular se ha comprobado que una delección en el gen de la melanina disminuye la patogenicidad del hongo; en nuestro caso, todas las cepas aisladas fueron melanina positivo. La ureasa regula el pH, facilitando el establecimiento del hongo dentro del hospedero. Dicha enzima estuvo presente en todas las cepas [4,13]. Aunque en la investigación no se midieron las concentraciones de estas enzimas, las pruebas bioquímicas evidenciaron que estas rutas metabólicas están activas en la levadura.

Para ser patógeno humano un organismo debe estar en capacidad de crecer a temperatura corporal. En nuestro caso el 96% de los aislamientos crecieron a 37 °C cumpliendo con esta característica básica de patogenicidad [5].

Conclusión

Este estudio corrobora la presencia de *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A en heces de paloma, ratifica a los eucaliptos como nicho ambiental de *C. neoformans* variedad *gattii*, serotipos B y C, reafirma a los almendros como potenciales hospederos para el serotipo C. Además se demuestra la importancia del piso térmico frío como hábitat del hongo.

Bibliografía

1. Adams E, Cooper B. Evaluation of a modified Wickerham medium for identifying medically important yeast. *Amer J Med Technol* 1974; 40: 377-388.
2. Argüero B, Garza GD, Torres ZM. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13: 27-28.
3. Bottone EJ, Kirschner PA, Salkin IK. Isolation of highly encapsulated *Cryptococcus neoformans* serotype B from a patient in New York City. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 186-188.
4. Callejas A, Ordóñez N, Rodríguez MC, Castañeda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol* 1998; 36: 341-344.
5. Casadevall A, Perfect J. *Cryptococcus neoformans*. Washington D.C., American Society for Microbiology, 1998.
6. Culter JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45: 187-218.
7. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* 1990; 336: 923-925.
8. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1642-1644.
9. Ellis DH, Pfeiffer TJ. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 321-325.
10. Emmons CW. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol* 1951; 62: 685-690.
11. Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg* 1955; 62: 227-232.
12. Fries B, Goldmand DL, Chemiak R, Rujin JU, Casadevall A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxilomannan structure. *Infect Immun* 1999; 67: 6076-6083.
13. García J, Casadevall A. Melazation of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to antimicrobial effects of silver nitrate. *Med Mycol* 2001; 39: 353-357.
14. Halliday CL, Carter A. Clonal reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 703-711.
15. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its applications to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 22-29.
16. Kwon-Chung KJ, Bennett J. Distribution of a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol* 1978; 4: 337-339.
17. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennet J. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B y C). *J Clin Microbiol* 1982; 15: 535-537.
18. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 123-130.
19. Lazera MS, Pires FD, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, y Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol* 1996; 34: 127-131.
20. Mitchell T, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS -100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 515-548.
21. Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 407-408.
22. Sorrell S, Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 42-43.
23. Yamamoto Y, Kohno S, Koga H, Kakeya H, Tomono K, Kaku M, Yamazaki T, Arisawa M, Hara K. Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3328-3332.
24. Zhun Y, Guibbons J, Garcia J, Casadevall A, Williamson P. Lacasse of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall associated virulence factor. *Infect Immun* 2001; 69: 5589-5596.