

ASOCIACION DE LEVADURAS DEL GENERO *CRYPTOCOCCUS* CON ESPECIES DE *EUCALYPTUS* EN SANTAFE DE BOGOTA

A. DUARTE, N. ORDOÑEZ & E. CASTAÑEDA (1)

RESUMEN

El aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotipo B, a partir del medio ambiente se estableció inicialmente en Australia en 1989, en asocio con el *Eucalyptus camaldulensis* y posteriormente con *E. tereticornis*. Con estos hallazgos se postuló que desde allí, el hongo se ha podido exportar, por medio de las semillas contaminadas, a otras regiones geográficas, incluyendo Colombia.

El objetivo de éste estudio fue identificar las levaduras del género *Cryptococcus* asociadas con especies de *Eucalyptus* sp., como primera evaluación en la ecología de *C. neoformans* var. *gattii* en nuestro país. Se realizó en Santafé de Bogotá, con una población de 100 árboles ubicados al centro, nororiente, oriente y occidente de la ciudad, recolectando de cada uno de ellos flores, frutos, hojas, cortezas y detritos; el procesamiento de las muestras incluyó extracción del material con una solución salina con antibióticos, siembra en medios selectivos e identificación de las especies con base en las características morfológicas, macro y microscópicas y bioquímicas.

Se aislaron 27 cepas de *Cryptococcus* pertenecientes a 9 especies de *Cryptococcus*, a partir de 21 árboles ubicados en 5 zonas diferentes de la ciudad. Se aisló *C. neoformans* y se identificó como *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo A. Estos datos iniciales son importantes como primera evaluación de la asociación de *Cryptococcus* sp. con los *Eucalyptus* en nuestro país.

UNITERMOS: *C. neoformans*; Ecología; *C. neoformans*; Serotipos.

INTRODUCCION

La criptococosis es una micosis sistémica oportunista, que se inicia cuando penetran al organismo, por vía aérea, estructuras infecciosas del *Cryptococcus neoformans*¹⁸, una levadura encapsulada que posee 4 serotipos clasificados con base en las diferencias antigénicas de sus polisacáridos capsulares^{10,35}; estos serotipos han sido reagrupados en dos variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C)¹⁵.

Entre las numerosas diferencias de las dos variedades, se destacan la distribución geográfica de los casos clínicos y su ecología^{7,20}. La criptococosis ocasionada

por el *C. neoformans* var. *neoformans* tiene una distribución mundial y con base en los numerosos aislamientos realizados, el hábitat se ha descrito asociado con tierras contaminadas con excretas de aves, especialmente palomas^{3,11,12,18,23}.

La distribución de los casos clínicos ocasionados por *C. neoformans* var. *gattii* está restringida a áreas tropicales y subtropicales¹⁶, el hábitat de la levadura era desconocido hasta 1989⁵. La alta incidencia de criptococosis producida por esta variedad en aborígenes australianos condujo a postular que el hábitat de la levadura debería estar relacionado con el medio ambien-

(1) Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud. Avenida El Dorado, carrera 50. Santafé de Bogotá, Colombia.

te de ese país ⁴. Por esta razón, en ese año, se evaluaron durante 8 meses muestras de aire, suelo y vegetación en el Valle de Ballosa, al sur de Australia, recuperándose por primera vez *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B, inicialmente en detritos de *Eucalyptus camaldulensis* y posteriormente a partir de la corteza, hojas y detritos del árbol en flor, estableciéndose de esa manera, una asociación con el árbol ⁵. Posteriormente, el *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B, fue aislado a partir de *E. tereticornis*, en una región diferente a la evaluada en el estudio inicial ³¹. Dos años más tarde, en San Francisco, California, Estados Unidos, el mismo grupo de investigadores aisló *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B de *E. camaldulensis*; este es el único informe conocido del aislamiento de la levadura a partir de éstos árboles fuera de Australia ³⁰. Se informó otro aislamiento de *C. neoformans* var. *gattii* a partir del medio ambiente en Río de Janeiro, a partir de excretas de murciélagos ¹⁹.

La distribución de las variedades y serotipos de *C. neoformans* en muestras clínicas y del medio ambiente ha sido objeto de estudio en el laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Salud en los últimos 10 años ^{24, 25, 26, 27, 28}, por tal motivo, se decidió iniciar el estudio de la ecología de *C. neoformans* var. *gattii* en Colombia, empleando muestras de *Eucalyptus* sp. de diferentes zonas de Santafé de Bogotá, con el fin de evaluar una metodología para el procesamiento de material vegetal e identificar la asociación de levaduras del género *Cryptococcus* con éste tipo de árboles.

MATERIALES Y METODOS

1. Población de estudio, tamaño y toma de la muestra:

La población objeto de estudio fue constituida por árboles adultos de *Eucalyptus* sp. distribuidos en 13 zonas ubicadas al nororiente, oriente, occidente y centro de Santafé de Bogotá. El criterio de selección de las zonas fue la presencia de más de 15 árboles florecidos ⁵. Se realizó un censo en las 13 zonas y el número de árboles seleccionados se estimó empleando el programa Stat-Cal del Epi-Info ⁹; con una probabilidad del 5% de recuperación de las levaduras, un error del 1% y un intervalo de confianza del 95-99%, el número de árboles de *Eucalyptus* sp. estimado fue 100.

Se colectaron por duplicado, de cada uno de los árboles flores, frutos, hojas, cortezas y detritos (material vegetal en descomposición colectado en la base del árbol, mezclado con tierra); este material se colocó en

bolsas plásticas debidamente marcadas, registrando la temperatura y humedad de los días de recolección. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su procesamiento y el tiempo máximo de almacenamiento fue de dos semanas.

2. Procesamiento de las muestras:

Uno de los duplicados de las muestras de hojas, flores, frutos de cada árbol se prensaron para un estudio taxonómico posterior.

Para el aislamiento de las levaduras del género *Cryptococcus*, se utilizó la técnica descrita por CIVILA & CONTI-DIAZ ² con algunas modificaciones: 5 g del material colectado de cada árbol (flores, frutos de los cuales se tomaron las semillas, hojas y cortezas) se suspendieron inicialmente en 5 ml de solución tampón fosfato (PBS) y se maceraron en un mortero, el volumen final se completó a 30 ml en un tubo de poliestireno de 50 ml; únicamente los detritos se suspendieron directamente en 30 ml de PBS; los tubos se agitaron fuertemente por 2 minutos y se dejaron en reposo. Del sobrenadante se tomaron 5 ml a diferentes alturas y a estos se les adicionaron 100 µl de una mezcla de antibióticos: penicilina (20 U/l), estreptomina (20U/l) y cloranfenicol (125 mg/l).

De la suspensión, se sembraron 100 µl en los medios de ácido caféico ²¹ y extracto de nabo seco, éste último medio se preparó de acuerdo con la fórmula del medio de semillas de *Guizotia abyssinica* ³³, reemplazando estas semillas por semillas de nabo seco (N. Ordoñez, comunicación personal).

3. Aislamiento, identificación y serotipificación:

Las cajas se incubaron a 27°C por dos semanas y fueron examinadas diariamente para determinar y aislar las colonias de levaduras que presentaran color crema o café (actividad de la enzima fenol-oxidasa) ³².

La identificación de las levaduras del género *Cryptococcus* fue realizada inicialmente con base en las características microscópicas y en la determinación de la ureasa ¹⁷. Las levaduras ureasa positivas se identificaron posteriormente con la determinación de la nitrato-reductasa ¹³, el patrón de asimilación de azúcares ¹ y la actividad de la fenol-oxidasa ³².

El medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) ^{15, 22}, fue utilizado para clasificar las variedades de *C. neoformans* y la serotipificación de ésta especie se realizó con la técnica de aglutinación en

lámina, empleando los antisueros específicos preparados en el laboratorio ³⁵.

RESULTADOS

Las 13 zonas evaluadas, el número de árboles estudiados en cada una de ellas y la numeración asignada a cada árbol se presenta en la tabla 1, las muestras fueron colectadas en agosto 2 y noviembre 2 y 22 de 1992, la temperatura y la humedad promedio de los días de recolección fue de 16,42°C y 62,5% respectivamente. El 80% de los árboles estaban florecidos y sin enfermedad aparente.

TABLA 1
Zonas del muestreo de *Eucalyptus* sp. en Santafé de Bogotá

Zona	Ubicación	n	Nº Arbol
01		4	001 - 004
02	Oriente	4	005 - 008
13		5	096 - 100
03		2	009 - 010
04		9	011 - 019
05	Centro	4	020 - 023
06		2	024 - 025
12		23	073 - 095
07		4	026 - 029
08	Occidente	3	030 - 032
09		7	033 - 039
10	Nororiente	3	040 - 042
11		30	043 - 072

En la tabla 2, se anotaron el número del árbol y la especie o especies de *Cryptococcus* aisladas en cada uno de ellos. De los 100 árboles evaluados, fueron recuperados 572 levaduras, con un promedio de 6 levaduras por árbol, pero solo 27 de ellas, procedentes de 21 árboles, fueron identificadas como especies del género *Cryptococcus*, 19 de las cuales fueron recuperadas a partir de ácido caféico y 8 a partir del extracto de nabo seco. Se identificaron 9 especies: *C. laurentii* en 8 oportunidades, *C. macerans* en 5, *C. ater* y *C. uniguttulatus* en 4, *C. neoformans* en dos y *C. hungaricus*, *C. albidus*, *C. kuetzingii* y *C. heveanensis* en una. El *C. neoformans*, recuperado en dos colonias a partir de detritos del mismo árbol fue identificado en el medio CGB y por aglutinación en lámina como *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo A. La actividad de la fenol-oxidasa solo se visualizó en el *C. neoformans* var. *neoformans* a los 25 días después de sembrada en el ácido caféico.

Se realizaron aislamientos en 6 de las 13 zonas evaluadas, 1 en la zonas 1 y 4, 4 en la 7 y 9, 7 en la 11 y 10 en la 12.

La frecuencia de *Cryptococcus* sp. aislados con relación a las muestras colectadas se muestra en la tabla 3. El orden de frecuencia de aislamientos a partir de las muestras fue: hojas, detritos, flores y cortezas y frutos.

DISCUSION

Las zonas evaluadas presentaron una población de árboles representativa del criterio de selección. La época en la cual se colectaron las muestras, los árboles estaban en floración, lo cual estuvo de acuerdo con lo descrito por ELLIS en su estudio, en el cual señala que la época en la cual se aisló *C. neoformans* var. *gattii* fue en la primavera ⁵. En las fechas de recolección, la temperatura y la humedad no variaron significativamente.

La recuperación de 27 especies de *Cryptococcus* sp. evaluó satisfactoriamente la metodología utilizada para

TABLA 2
Número del árbol de *Eucalyptus* sp. y especie aislada de *Cryptococcus*, en Santafé de Bogotá.

Nº Arbol	Espécie Aislada
002	<i>C. uniguttulatus</i>
014	<i>C. laurentii</i>
027	<i>C. uniguttulatus</i>
029	<i>C. neoformans</i>
	<i>C. neoformans</i>
	<i>C. laurentii</i>
033	<i>C. kuetzingii</i>
035	<i>C. laurentii</i>
	<i>C. uniguttulatus</i>
038	<i>C. ater</i>
043	<i>C. ater</i>
	<i>C. hungaricus</i>
044	<i>C. uniguttulatus</i>
046	<i>C. albidus</i>
049	<i>C. macerans</i>
053	<i>C. macerans</i>
075	<i>C. heveanensis</i>
076	<i>C. macerans</i>
	<i>C. ater</i>
077	<i>C. laurentii</i>
078	<i>C. macerans</i>
079	<i>C. ater</i>
083	<i>C. laurentii</i>
090	<i>C. laurentii</i>
	<i>C. laurentii</i>
091	<i>C. macerans</i>
092	<i>C. laurentii</i>
21	27

TABLA 3

Ralación de la especie de *Cryptococcus* aislada y las muestras de *Eucalyptus* recolectadas.

Especie	Muestra					Total
	Flor	Fruto	Hoja	Tallo	Detritos	
<i>C. laurentii</i>	2	2	1	1	2	8
<i>C. macerans</i>	2		2	1		5
<i>C. ater</i>		1	2	1		4
<i>C. uniguttulatus</i>			1	2	1	4
<i>C. neoformans</i>					2	2
<i>C. kuetzingii</i>	1					1
<i>C. hungaricus</i>			1			1
<i>C. albidus</i>					1	1
<i>C. heveanensis</i>			1			1
Total	5	3	8	5	6	27

el procesamiento de las muestras vegetales, lo cual nos permite emplearla en futuros estudios, esta metodología había sido descrita por CIVILA y CONTI-DIAZ en su estudio de ecología de *C. neoformans* con las excretas de palomas². El empleo de los medios selectivos permitió el aislamiento de levaduras del género *Cryptococcus*. El ácido caféico o el extracto de nabo seco proveen los substratos O-difenólicos necesarios para visualizar la actividad de la enzima fenol-oxidasa, evidenciando un color café³². Los medios con estos substratos han sido empleados ampliamente en estudios tanto de ecología como de clínica^{15,21,22,32,33}. La mejor recuperación de las colonias con características de *Cryptococcus* sp. fue en el medio de ácido caféico.

Cinco de las especies de *Cryptococcus* aisladas (*C. hungaricus*, *C. kuetzingii*, *C. uniguttulatus*, *C. ater* y *C. heveanensis*) no han sido descritas como agentes etiológicos en la micología médica, la asociación de *C. laurentii* y *C. albidus* con patología humana, a pesar de haber sido documentada en la literatura, continúa siendo discutida¹⁴. Los investigadores australianos no presentan en ninguno de sus informes datos sobre aislamientos de levaduras o especies diferentes a *C. neoformans*, por lo tanto no podemos comparar nuestro hallazgo.

Se recuperó *C. neoformans* var. *neoformans* de dos colonias, a partir de detritos de un mismo árbol lo que se podría interpretar como la posibilidad de una contaminación con excretas de aves⁸ o que también sea el hábitat de esta variedad, como lo sugieren SWINNE et al³⁴. El no encontrar *C. neoformans* var. *gattii* no

excluye la posibilidad de recuperarlo a partir de *Eucalyptus* sp. con otro tamaño de muestra. Adicionalmente, las especies de *Eucalyptus* evaluadas en este estudio no fueron clasificadas taxonómicamente, por esta razón, no se pueden relacionar con las especies descritas en la literatura.

Evaluando las zonas estudiadas, los datos no permiten relacionarlas con el número de aislamientos, porque el tamaño de la muestra, en cada una, fue diferente y se presentó un mayor aislamiento de levaduras en las zonas con el mayor número de muestras.

Con respecto a las muestras evaluadas, a partir de las hojas se aislaron más especies de *Cryptococcus*, de hecho, están expuestas al medio ambiente y no se les hizo ningún tratamiento de desinfección; los detritos, siguieron en frecuencia de aislamiento, pero a la vez presentaron mayor contaminación con mohos y levaduras. La flor y el tallo, exhibieron un igual número de levaduras; estas muestras también están expuestas al medio ambiente pero con corta vida como la flor y sustancias selectivas en el tallo como taninos y lignina²⁹. Es interesante y necesita una nueva evaluación el hallazgo de las tres especies encontradas en el fruto, del cual se tomaron las semillas, debido a que no es una muestra expuesta al medio ambiente. En el estudio realizado por ELLIS et al. en Australia, el *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* fue aislado en diferentes ocasiones en detritos, hojas y cortezas de *E. camaldulensis* y en detritos de *E. tereticornis*, en áreas geográficas donde la criptococosis por esa variedad es alta^{5,6,31}.

En Colombia, la incidencia de criptococosis producida por *C. neoformans* var. *gattii* es del 9%, relativamente baja comparada con el *C. neoformans* var. *neoformans* que se aísla en el 91% de los casos clínicos²⁶; los pocos casos identificados de *C. neoformans* var. *gattii* no permiten asociarlo con alguna área específica del país^{24,25,26}, por el momento, se siguen identificando las variedades de *C. neoformans* de los casos clínicos remitidos a nuestro laboratorio, de varias regiones del país y se planea continuar con el estudio de la ecología de esta levadura, evaluando las especies de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* en diferentes zonas geográficas.

SUMMARY

Isolation of *Cryptococcus* sp. associated with *Eucalyptus* trees in Santafé de Bogotá

Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans*

mans var. *gattii* was first made in Australia in 1989 by ELLIS. He established a specific association with the tree species *Eucalyptus camaldulensis* and *E. tereticornis*. Based on his findings, ELLIS proposed that the fungus could be exported from Australia to others regions, including Colombia, by means of infected seeds.

The purpose of this study was to isolate and identify *Cryptococcus* sp., associated with *Eucalyptus* trees; this is the first ecological evaluation of *C. neoformans* var. *gattii* in our country. A total of 100 *Eucalyptus* trees, distributed among 13 zones, located in the center, northeast, east and west of Santafé de Bogotá, were studied. Flowers, fruits, leaves, barks and *Eucalyptus* debris were collected. The samples were processed by extraction with saline solution containing antibiotics, cultured in selective media and the isolates were identified by morphological and biochemical characteristics.

Twenty-seven isolates of 9 *Cryptococcus* sp. were recovered from 21 *Eucalyptus* trees, from 5 zones. One *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A was recovered. The *Cryptococcus* associated with *Eucalyptus* is important because this is the first study done in our country.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAMS, E. D. & COOPER, B. H. - Evaluation of a modified Wickerham medium for identifying medically important yeast. *Amer. J. med. Technol.*, 40: 377-388, 1974.
- CIVILA, E. & CONTI-DIAZ, I. A. - Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de excretas de palomas en la ciudad de Montevideo. *Rev. urug. Pat. clín. Microbiol.*, 3: 41-48, 1976.
- CORRALES, C. S.; ORDÓÑEZ, N. M.; LONDOÑO, L. M. & CASTAÑEDA, E. - Determinación de anticuerpos contra *Cryptococcus neoformans* en un grupo de colomébófilos. *Biomédica.*, 7: 100-104, 1987.
- ELLIS, D. H. - *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. *J. clin. Microbiol.*, 25: 430-431, 1987.
- ELLIS, D. H. & PFEIFFER, T. J. - Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. clin. Microbiol.*, 28: 1642-1644, 1990.
- ELLIS, D. H. & PFEIFFER, T. J. - Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet*, 336: 923-925, 1990.
- ELLIS, D. H. & PFEIFFER, T. J. - The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Europ. J. Epidem.*, 8: 321-325, 1992.
- EMMONS, C. W. - Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J. Bact.*, 62: 685-689, 1951.
- EPI-INFO VERSION 5.00. Public Domain Software for Epidemiology and Disease Surveillance. Centers for Disease Control Epidemiology Program Office (CDC), Atlanta, Georgia and World Health Organization Global Programme on AIDS. Geneva, Switzerland, 1990.
- EVANS, E. E. - The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular agglutinations. *J. Immunol.*, 64: 423-430, 1950.
- GREER, D. L. & POLANIA, L. A. - Criptococosis en Colombia: resumen de la literatura y presentación de doce casos en el Valle del Cauca. *Act. med. Valle*, 8: 160-166, 1977.
- GROSE, E.; MARINKELLE, C. J. & STRERGEL, C. - The use of tissue cultures in the identification of *Cryptococcus neoformans* isolated from Colombian bats. *Sabouraudia*, 6: 127-132, 1968.
- HOPKINS, J. M. & LAND, G. A. - Rapid method for determining nitrate utilization by yeast. *J. clin. Microbiol.*, 5: 407, 1977.
- KRAJDEN, I.; SUMMERBELL, R. C.; KANE, J. et al. - Normally saprobic *Cryptococcus* isolated from *Cryptococcus neoformans* infections. *J. clin. Microbiol.*, 29: 1883-1887, 1991.
- KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I. & BENNETT, J. E. - Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J. clin. Microbiol.*, 15: 535-537, 1982.
- KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. - High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zbl. Bact. Hyg.*, 257: 213-218, 1984.
- KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B. L. & BOOTH, J. C. - Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, 55: 1751-1754, 1987.
- KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. - Cryptococcosis. In: KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. *Medical mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992. p. 397-446.
- LAZERA, M. S.; WANKE, B. & NISHIKAWA, M. M. - Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* in urban areas of Rio de Janeiro, Brazil. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 11., Montreal, ISHAM, 1991. Abstracts. p. 99.
- LEVITZ, S. M. - The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev. infect. Dis.*, 13: 1163-1169, 1991.
- MCGINNIS, M. R. - Media and reagents In: MCGINNIS, M. R. - *Laboratory handbook of medical mycology*. New York, Academic Press, 1980. p. 523.
- MIN, K. H. & KWON-CHUNG, K. J. - The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 261: 471-480, 1986.
- MIRA, C.; ANZOLA, R.; MARTINEZ, A. et al. - Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de materiales contaminados con excretas de palomas en Medellín, Colombia. *Antioquia méd.*, 18: 33-41, 1968.
- ORDÓÑEZ, N., CASTAÑEDA, E. & GUZMAN, M. - Criptococosis.

- Estudio de catorce casos comprobados por el laboratorio. *Biomédica*, 3: 87-93, 1981.
25. ORDOÑEZ, N.; CASTILLO, J. & MORENO, G. S. - Criptococosis: diagnóstico por el laboratorio. *Biomédica*, 7: 37-41, 1987.
26. ORDOÑEZ, N. & CASTAÑEDA, E. - Serotipificación de cepas colombianas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes. En Resúmenes de XI Congreso Colombiano de Medicina Interna. *Acta méd. colomb.*, 15: 261, 1990.
27. ORDOÑEZ, N. - Serotipificación y determinación de la fase sexual de *Cryptococcus neoformans* aisladas en Colombia. Santafé de Bogotá D. C., 1992 (Tesis de Maestría en Biología da Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias).
28. ORDOÑEZ, N., & CASTAÑEDA, E. - La cryptococosis y su agente etiológico. *Medicas UIS*, 6: 207-215, 1992.
29. PENFOLD, A. R. & WILLIS, J. L. -The eucalypts. London, World Crops Books, 1961.
30. PFEIFFER, T. J. & ELLIS, D. H. - Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. (Letter). *J. infect. Dis.*, 163: 929-930, 1991.
31. PFEIFFER, T. J. & ELLIS, D. H. - Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J. med. vet. Mycol.*, 30; 407-408, 1992.
32. SHAM, C. E. & KAPICA, L. - Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Appl. Microbiol.*, 24: 824-830, 1972.
33. SHIELDS, A. - Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 151: 208-209, 1966.
34. SWINNE, D.; BAUWENS, L. & DESMENT, P. - More information about the natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY. ISHAM, 1992. p. 4.
35. WILSON, D. E.; BENNETT, J. E. & BAILEY, J. W. - Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 127: 820-823, 1968.

Recebido para publicação em 23/07/1993.

Aceito para publicação em 04/11/1993.