

Contribución al estudio de la criptococosis infantil en Cuba

Contribution to the study of infant cryptococosis in Cuba

Dra. C. María Teresa Illnait Zaragoza^I, Dr. Gerardo Félix Martínez Machín,^I
Dr. C. Carlos Manuel Fernández Andreu,^I MSc. Juan José Marchena
Bequer,^{II} MSc. Mayda Rosa Perurena Lancha^I

^I Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

^{II} Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: a partir de 1998 en el laboratorio de micología del Instituto "Pedro Kourí" se observó un incremento del número de aislamientos de *Cryptococcus* obtenidos de niños seronegativos al VIH con meningoencefalitis. Los reportes de criptococosis infantil a nivel mundial son infrecuentes y generalmente se encuentran asociados al sida.

Objetivo: estudiar la criptococosis infantil en Cuba a través de la evaluación integral de 7 casos.

Métodos: se realizó un estudio retrospectivo integral, se revisaron las historias clínicas de 7 pacientes pediátricos afectados por criptococosis meningoencefálica y se caracterizaron los aislamientos obtenidos (uno de cada paciente). A estos se les determinó la especie, variedad, serotipo, patogenicidad en un modelo murino y susceptibilidad a la anfotericina B.

Resultados: la edad media de los niños fue de 5,8 años, con ligero predominio del sexo femenino (4:3). Los síntomas más frecuentes resultaron la cefalea, fotofobia, fiebre y los vómitos. En 6 pacientes el estudio citoquímico del líquido cefalorraquídeo y el examen imaginológico de cráneo evidenciaron anomalías. El diagnóstico microbiológico se realizó mediante examen directo y cultivo. Todos los aislamientos correspondieron con *Cryptococcus neoformans* serotipo A y la anfotericina B mostró una concentración mínima inhibitoria menor o igual que 0,125 mg/mL. El 85,7 % mostró actividad fenoloxidasas y elevada letalidad en los animales infectados (71,4-100 %).

Conclusiones: el pronóstico de la meningoencefalitis por *Cryptococcus* está estrechamente ligado a un diagnóstico precoz. Esta realidad hace que deba tenerse siempre presente, por lo que los datos aportados bien pudieran servir de alerta a los médicos de asistencia.

Palabras clave: *Cryptococcus neoformans*, meningoencefalitis, niños, susceptibilidad, patogenicidad.

ABSTRACT

Introduction: since 1998, an increasing number of *Cryptococcus* isolates obtained from HIV-negative children with meningoencephalitis was observed in the mycology laboratory at "Pedro Kourí" Institute. The global reports of child cryptococcosis are rare and usually associated with AIDS.

Objectives: to study child cryptococcosis in Cuba through the comprehensive evaluation of 7 cases.

Methods: the clinical histories of seven pediatric patients with cryptococcal meningoencephalitis were examined and the obtained isolates (one per patient) were characterized. The species, variety, serotype, pathogenicity in a mouse model and amphotericin B susceptibility of the isolates were determined.

Results: average age of the children was 5.8 years, with a slight female predominance (4:3). The most common symptoms were headache, photophobia, fever and vomiting. The cytochemical study of cerebral spinal fluid and skull imaging test showed abnormalities in 6 patients. The microbiological diagnosis was made through direct examination and culture. All the isolates were from *Cryptococcus neoformans* serotype A and amphotericin B showed a minimum inhibitory concentration ≤ 0.125 mg/mL. In the group, 85.7 % showed phenoloxidase activity and high lethality rate in infected animals (71.4 to 100 %).

Conclusions: the prognosis of cryptococcal meningoencephalitis is closely linked to early diagnosis, therefore, this should be always kept in mind and the provided data from this study may serve as warning to attending physicians.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, meningoencephalitis, children, susceptibility, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

De las casi 100 especies que hoy comprende el género *Cryptococcus*, el complejo de especies *Cryptococcus neoformans* constituye el principal responsable de las infecciones tanto en humanos como en animales.¹ Esta levadura es ubicua en la naturaleza con una amplia distribución mundial. Se piensa que en la mayoría de los casos alcanza los pulmones después de ser inhalada, ocasionando infección subclínica a este nivel.² En algunos de estos casos puede ocurrir diseminación a partir de esta localización y de manera subsecuente enfermedad sistémica con particular predilección por las meninges. Esta forma clínica compromete seriamente la vida del paciente y se presenta por lo general en individuos con algún tipo de alteración del sistema inmunológico; sobre todo en pacientes con sida, entre los que se reconoce como una de las principales infecciones oportunistas.^{3,4}

Desde que se diagnosticaron los primeros casos de criptococosis en pacientes con sida en Cuba, se hizo evidente el incremento de la frecuencia de esta micosis. En el laboratorio de micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LMIPK) se diagnostican entre 8 y 20 casos al año.⁵ Sin embargo, el análisis de una serie de 211 autopsias practicadas a pacientes con VIH/sida, reveló la presencia de criptococosis en más de 29 % de los fallecidos, lo que demostró que este es un trastorno más grave y frecuente que lo reportado comúnmente.⁶

Entre 1979 y 1997 en el LMIPK solo se había hecho el diagnóstico de un caso de criptococosis infantil. Esta situación cambió de modo radical en 1998, año en el que se elevó la positividad a 7, en tanto que en los 13 años siguientes se diagnosticaron un total de 5 meningitis criptocócicas en pacientes pediátricos. Esta situación motivó la revisión de las historias clínicas y la caracterizaron los aislamientos obtenidos de los casos, que marcaron el inicio de una nueva etapa de la criptococosis infantil en Cuba.

MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo de todos los casos de criptococosis infantil diagnosticados en el LMIPK en 1998, por ser el año que mostró mayor número de aislamientos obtenidos en el LMIPK de *C. neoformans* de pacientes pediátricos.

Se revisaron las historias clínicas de los 7 niños los cuales procedían de los hospitales pediátricos "William Soler", "Juan Manuel Márquez" y Hospital Pediátrico de Centro Habana. Se recogieron como datos de interés el sexo, la edad, la procedencia, la fecha de diagnóstico de la criptococosis, los antecedentes de salud, los principales síntomas y signos, así como los resultados de los complementarios realizados, el tratamiento administrado y la evolución del paciente.

Aislamientos estudiados

Se estudiaron 7 aislamientos de *Cryptococcus* recuperados a partir de las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de los niños incluidos en este estudio (un aislamiento por niño). Los aislamientos se encontraban conservados en agua destilada estéril a temperatura ambiente en la colección de cepas del LMIPK.

Cepas controles

Se utilizaron las cepas *C. neoformans* var. *grubii* NIH 18 A 1267, *C. neoformans* var. *neoformans* NIH 52 D y *C. gattii* ser. C NIH 18 C 1209 provenientes de la Unidad de Micología del Instituto Pasteur, París; *C. gattii* ser. B LMIPK 0135; *C. laurentii* LMIPK 027 y *Candida albicans* ATCC 90028. Hasta el momento del estudio estas estaban conservadas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Caracterización microbiológica

Incluyó pruebas morfológicas (características macromorfológicas y micromorfológicas del cultivo y filamentación en agar harina de maíz con Tween 80), fisiológicas (termotolerancia a 37 °C), bioquímicas (auxonograma, producción de enzimas ureasa y fenoloxidasa, así como crecimiento en el medio canavanina-glicina-azul de bromotimol),⁷ la determinación del serotipo mediante aglutinación con el juego comercial Crypto Check Iatron (según instrucciones del fabricante) y la sensibilidad a la anfotericina B mediante microdilución en medio líquido.⁸ Se

consideraron como aislamientos resistentes aquellos para los que la concentración mínima inhibitoria del antifúngico resultó $\geq 2 \mu\text{g/mL}$.⁹

Estudio de patogenicidad in vivo

Se emplearon ratones lactantes de la familia Balb/c de 2 a 3 días de nacidos, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio. Por cada aislamiento a estudiar, se creó un grupo de 7 animales, los cuales se inocularon por vía intracraneal con una suspensión celular correspondiente a la escala 1 de McFarland. Como control se empleó un grupo de igual número de animales a los que se les administró solución salina estéril por la misma vía. Se realizaron observaciones diarias hasta 3 semanas. Aquellos con alteraciones de las funciones vitales se sacrificaron por dislocación cervical y se les practicó autopsia. El cerebro, los pulmones y el bazo se examinaron microscópicamente con nigrosina en busca de levaduras capsuladas.

Consideraciones éticas

Los animales se manipularon de acuerdo con los principios éticos de la experimentación animal. Se cumplieron estrictamente las buenas prácticas de laboratorio, así como todas las medidas de bioseguridad para el trabajo y la manipulación de microorganismos según los niveles de riesgo establecidos por la lista oficial de agentes biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas de la Resolución No. 38/06 del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente vigente en Cuba. Para la revisión de las historias clínicas de los pacientes se solicitó permiso a los facultativos y administrativos del hospital en cada caso.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los datos clínico-epidemiológicos recogidos durante la revisión de las historias clínicas de los pacientes. La edad promedio fue de 5,8 años, con ligero predominio del sexo femenino (4:3). Los pacientes procedían de diferentes provincias de Cuba y como dato epidemiológico de interés se recogió en todos los casos el contacto directo o indirecto con palomas. En solo 2 pacientes se registró antecedentes de mononucleosis infecciosa y aplasia medular (pacientes 4 y 6, respectivamente).

Los principales síntomas y signos referidos al ingreso resultaron: cefalea (frontal, retroorbital y temporal, la cual se comportó de forma intermitente para luego aumentar en intensidad y frecuencia), fotofobia, fiebre y vómitos en 100 % de los casos, así como alteraciones meníngeas (85,7 %) (tabla 1). La fiebre se presentó en todos los pacientes en el período inicial de forma insidiosa y después en picos diarios hasta llegar a ser persistente en los casos más graves.

El 57,1 % de los pacientes tuvo una evolución satisfactoria hacia la curación, en tanto 2 de ellos desarrollaron episodios recurrentes de la enfermedad y secuelas neurológicas (hidrocefalia). Uno de los niños (14,2 %) falleció a los pocos días de iniciado el tratamiento (tabla 1).

Tabla 1. Datos clínico-epidemiológicos de los niños con diagnóstico de meningoencefalitis por *Cryptococcus neoformans*

Datos		Paciente No.						
		1	2	3	4	5	6	7
Generales	Edad (años)	9	3	3	5	4	2	15
	Sexo	F	F	F	M	F	M	M
	Provincia*	GR	HO	HA	GU	CH	IJ	PR
	Contacto con palomas	+	+	+	+	+	+	+
	Antecedentes	-	-	-	MI	-	AM	-
Principales síntomas y signos	Cefalea	+	+	+	+	+	+	+
	Fiebre	+	+	+	+	+	+	+
	Fotofobia	+	+	+	+	+	+	+
	Náuseas y vómitos	+	+	+	+	+	+	+
	Alteraciones de conciencia	-	+	+	+	+	+	+
	Signos meníngeos	+	NR	+	-	+	+	+
Evolución	Favorable	x	x	x		x		
	Tórpida				x		x	
	Fatal							x
Tratamiento (semanas)	Ataque	Flu (3) Flu+Itr (3)	AnfB+Flu (3)	AnfB+Flu (3)	AnfB (2)	AnfB+Flu (4)	AnfB (3)	AnfB (2)
	Mantenimiento	Flu (3)	Flu (4)	Flu (4)	Flu (3)	Flu (4)	Flu (6)	-

NR: no recogido en la historia clínica, F: femenino, M: masculino, CH: Ciudad de La Habana, HA: La Habana, IJ: Isla de la Juventud, GU: Guantánamo, PR: Pinar del Río, GR: Granma, HO: Holguín, MI: mononucleosis infecciosa, AM: aplasia medular, Flu: fluconazol, Itr: itraconazol, AnfB: anfotericina B.
* Según la división político-administrativa de Cuba en el momento del diagnóstico de los pacientes.

En 6 pacientes se utilizó como terapia de ataque la anfotericina B a dosis de 0,5 a 1 mg/kg/d durante 2 a 4 semanas. En 3 de los casos esta se asoció al fluconazol en dosis de 6 a 12 mg/kg/d. El fluconazol además se empleó en la terapia de mantenimiento en la mayoría de los casos y en la fase de ataque tanto sola como combinada con itraconazol (paciente No. 1) (tabla 1).

En la tabla 2 se exponen los resultados de los principales exámenes complementarios indicados en cada caso. En 6 de los 7 pacientes (85,7 %) se encontró como principal alteración en el LCR analizado al inicio del ingreso,

aumento de la celularidad a predominio linfocitario y en la mayoría de los pacientes tendencia a la normalización en los análisis evolutivos. En los 4 pacientes a los que se les realizó estudio de la inmunidad celular se detectaron valores de linfocitos T CD4⁺ por debajo de los normales según la edad.

Solo se encontró evidencia de alteraciones pulmonares en la radiografía de tórax practicada en uno de los pacientes. En cambio, para 6 de los niños la tomografía axial computarizada de cráneo arrojó diferentes alteraciones (tabla 2). Aunque a todos los pacientes se les indicó hemograma con diferencial y eritrosedimentación, estos no evidenciaron alteraciones significativas (datos no mostrados).

Tabla 2. Resultados de los principales exámenes complementarios realizados a los niños con diagnóstico de meningoencefalitis por *Cryptococcus neoformans*

Paciente	LCR (células/mL)		Conteo de CD4 ⁺	Estudios imaginológicos	
	Inicial	Evolutivo		Rayos X de tórax	Tomografía axial computarizada
1	Linfocitosis (287 células/mm ³)	Normal	26 %	Normal	Negativa
2	Normal	Normal	40 %	Normal	Edema difuso
3	Turbio, Pandy ++, Linfocitosis (150 células/mm ³)	Normal	35 %	Normal	Ventriculitis
4	Turbio, Linfocitosis (374 células/mm ³)	Turbio, Pandy +, linfocitosis	NR	Opacidad en velo base derecha	Dilatación del IV ventrículo, hidrocefalia, tumor de tallo
5	Turbio, Pandy ++, Linfocitosis (100 células/mm ³)	Normal	31 %	Normal	Ligera ventriculitis
6	Turbio, Pandy +++, Leucocitos (777 células/mm ³)	Turbio, Pandy ++, * leucocitos 2 241-800 células/mm ³	NR	Normal	Hidrocefalia, criptococoma en fosa posterior
7	Turbio, Pandy++, Linfocitosis (965 células/mm ³)	NR	NR	Normal	Edema difuso

NR: no recogido en la historia clínica, LCR: líquido cefalorraquídeo.

* Datos recogidos de cuatro estudios citoquímicos evolutivos.

Solo el aislamiento obtenido del paciente No. 3 no mostró actividad fenoloxidasa. No obstante, la caracterización microbiológica de todos los aislamientos recuperados del LCR de cada paciente indicó que estos pertenecen a la especie *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) y se consideraron sensibles a la anfotericina B (CMI= 0,125-0,25 µg/mL).

En la figura aparecen graficadas las curvas de supervivencia obtenidas en el estudio de patogenicidad *in vivo* realizado en ratones, el cual reveló aumento progresivo de fallecimientos a partir de la segunda semana; 4 de los aislamientos (aquellos procedentes de los pacientes No. 1, 4, 6 y 7) causaron daños incompatibles con la vida en la totalidad de los ratones antes de alcanzar los 21 días después de inoculados. Los animales que arribaron al final del experimento (2 del grupo No. 5 y 1 cada uno de los grupos No. 2 y 3) mostraron aumento de volumen de la región cefálica, erizamiento de los pelos, ataxia y retraso en el desarrollo, al compararlos con los ratones del grupo control. El examen microscópico con nigrosina de los órganos diana demostró presencia de levaduras capsuladas características de *C. neoformans* en todos los animales infectados.

Función de supervivencia acumulada

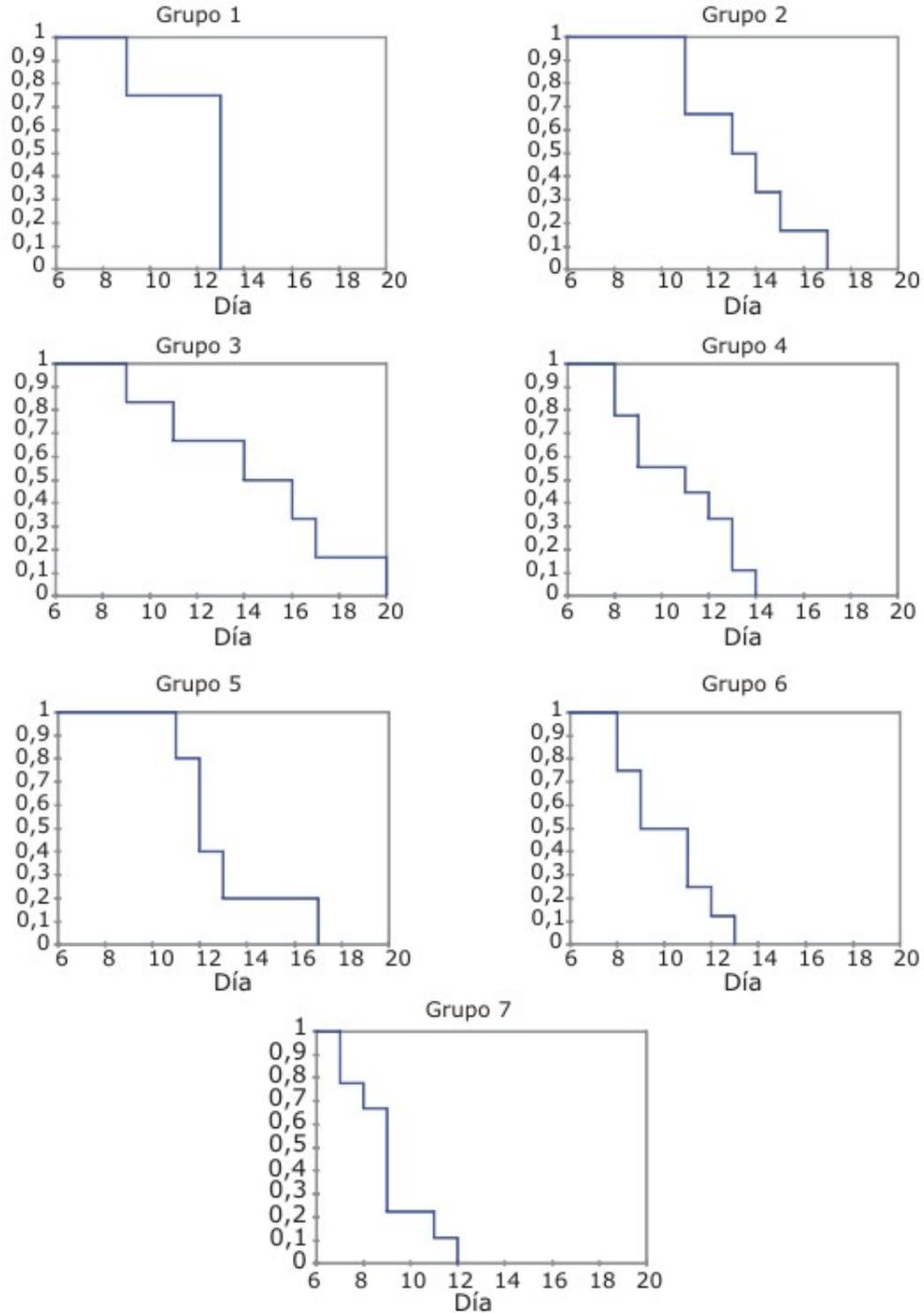


Fig. Curvas de supervivencia de ratones Balb/c lactantes infectados por vía intrace-rebral con suspensiones de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* recuperados del líquido cefalorraquídeo de los pacientes estudiados (grupos del 1 al 7) y solución salina (control).

DISCUSIÓN

La criptococosis es más frecuente en individuos con trastornos de la inmunidad mediada por células. La infección con el VIH resulta en la actualidad la condición predisponente más importante para padecer esta enfermedad.⁴ No obstante, en comparación con los adultos, el número de niños que adquieren criptococosis se considera extremadamente bajo incluso en África sub-Sahariana, "hogar" de más de 90 % de todos los niños seropositivos al VIH.^{3,10,11}

La especie *C. neoformans* presenta una amplia distribución mundial y se reporta en todas las latitudes.¹² Los resultados de este trabajo demuestran la presencia de este agente de la región oriental y occidental de Cuba, porque los casos estudiados procedían de diferentes provincias de estas regiones de la isla y no estaban relacionados entre sí.

C. neoformans var. *grubii* se aísla a partir de las más disímiles fuentes naturales, no obstante, el mayor número de especímenes se ha recuperado a partir de excretas de aves, especialmente de palomas domésticas (*Columba livia*), las que constituyen, entre los conocidos, su nicho ecológico más importante.¹³ La referencia del contacto directo o indirecto con las excretas de palomas en el 100 % de los pacientes incluidos en este estudio, las pone en evidencia como un importante factor de riesgo para el desarrollo de la infección por este agente.

La mayoría de los casos de criptococosis pediátrica reportados antes involucran niños entre 6 y 12 años de edad.^{3,10,11} No obstante, *Miglia* y otros, al igual que en el presente estudio, encontraron un predominio de esta micosis en edades más tempranas pero estrechamente vinculado al sida.¹⁴

De forma general, la literatura muestra mayor incidencia de infección por *Cryptococcus* en el sexo masculino.^{3,11,14} Sin embargo, este estudio demuestra una relación algo superior del sexo femenino. Estas referencias resultan de gran valor clínico-epidemiológico tanto para Cuba como para otros países, al sugerir que el sexo no constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la criptococosis, especialmente en edad pediátrica.

Reportes internacionales de estudios serológicos realizados entre la población general indican una alta prevalencia de infección por *C. neoformans*, la cual parece ser adquirida durante la infancia. A pesar de esto, no todos los individuos desarrollan la enfermedad, porque este proceso está condicionado por 3 factores fundamentales como el estado de los mecanismos de defensa del hospedador, la virulencia del agente infectante y la cuantía del inóculo.¹⁵

Llama la atención que ninguno de los pacientes estudiados era seropositivo al VIH y que en 5 de ellos no se pudo constatar antecedente de alguna condición inmunosupresora ni datos de laboratorio que permitieran sospechar su existencia en el momento de la infección. De otra parte, no se puede asegurar que los valores de linfocitos T CD4⁺ por debajo de los normales para la edad de cada paciente en aquellos casos a los que se les practicó estudio inmunológico, sean la causa o consecuencia de la enfermedad, porque se ha descrito disminución de estas células durante el desarrollo de la criptococosis.⁴

El número relativamente alto de pacientes en apariencia inmunocompetentes con relación a lo encontrado en la literatura refuerzan la hipótesis de que, hasta el presente, el defecto exacto del sistema inmune responsable de la susceptibilidad a *C. neoformans* es desconocido y que la enfermedad pudiera asociarse a la exposición a una gran cantidad de inóculo o a la inhalación de especímenes más

virulentos.² En este sentido, todos los aislamientos recuperados a partir del líquido cefalorraquídeo de los niños incluidos en el estudio ocasionaron lesiones incompatibles con la vida en más de 70 % de los ratones infectados, por su parte, en los sobrevivientes se demostró la presencia de abundantes levaduras en los órganos diana, con lo cual quedó demostrada la elevada capacidad patogénica de esos aislamientos.

La ausencia de alteraciones en los parámetros citoquímicos del LCR, tal como se demuestra en el paciente No. 2, obliga a no descartar la forma meningoencefálica de la criptococosis en situaciones similares. En estos casos, se recomienda realizar determinaciones seriadas e insistir en estudios más específicos en busca del agente etiológico, como el examen directo con tinta china, la detección de antígeno mediante la prueba de aglutinación al látex, y el cultivo e identificación.

Estudios precedentes de caracterización de aislamientos cubanos demuestran el predominio total de *C. neoformans* var. *grubii* (ser. A)¹⁶ y los resultados derivados de este trabajo permiten confirmar lo reportado anteriormente. Estos datos a su vez coinciden con los de otros autores a nivel internacional, los cuales evidencian la amplia distribución de esta especie a nivel mundial.^{2,17}

Debido al incremento de esta enfermedad después de la aparición del sida, la identificación de las especies del complejo *C. neoformans* aisladas a partir de muestras clínicas constituye una herramienta útil, tanto en el reconocimiento de las posibles fuentes de infección como en la conducta a seguir, porque existen importantes diferencias clínicas y de respuesta al tratamiento entre los pacientes afectados por estos.¹ En la literatura consultada no se encontraron reportes de estudios de variedad y serotipos en aislamientos recuperados de niños.

Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de la anfotericina B frente a los aislamientos incluidos en este estudio coinciden con los reportados por otros autores.¹⁸ Este constituye el antifúngico de primera línea en la terapia de ataque durante la meningitis criptocócica, dado los bajos porcentajes de resistencia *in vitro* demostrados. No obstante, algunos autores atribuyen este hecho a la carencia de una metodología eficaz y reproducible para su determinación, debido a las cifras alarmantes de fallos terapéuticos y recaídas, lo que indica la carencia de un régimen fungicida óptimo para el control de la infección.⁹ Esta situación hace necesario la evaluación de nuevas estrategias y hoy día se investiga sobre un espectro amplio de opciones, que incluyen desde la inmunización hasta la evaluación de nuevos antifúngicos.¹⁹

Debido a que la criptococosis infantil es una enfermedad poco frecuente y que los síntomas de inicio pueden ser muy discretos, se requiere un alto índice de sospecha clínico-epidemiológica para establecer un diagnóstico precoz. La presencia de fiebre y cefalea persistentes deben ser criterios suficientes para realizar examen directo del líquido cefalorraquídeo con tinta china o nigrosina, así como estudios microbiológicos que permitan confirmar o descartar la enfermedad, porque la infección con el complejo de especies *C. neoformans* resulta fatal cuando no se impone tratamiento específico de forma oportuna. Esta experiencia resulta de gran importancia con vistas a incrementar el índice de sospecha clínica y la calidad del diagnóstico microbiológico en los laboratorios de la red de salud.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor René Gato y la licenciada Iliana Valdés del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" por la valiosa contribución en el análisis de los datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Wickes BL, Fell JW. Systematics of the genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. In: Heitman J, editor. *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 3-15.
2. del Poeta M, Casadevall A. Ten challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *Mycopathologia*. 2011; DOI 10.1007/s11046-011-9473-z. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/21948062/reload=0;jsessionid=u13KHP1BrIA9ZCad2yOG.0>
3. Yuanjie Z, Jianghan C, Nan X, Xiaojun W, Hai W, Julin G. Cryptococcal meningitis in immunocompetent children. *Mycoses*. 2011;55:168-71.
4. Perfect JR. The impact of the host on fungal infections. *Am J Med*. 2012. doi:10.1016/j.amjmed.2011.10.010. Available at: <http://www.amjmed.com/article/S0002-9343%2811%2900905-3/abstract>
5. Illnait MT, Valdés IC, Fernández CM, Mendoza D, Perurena MR, Martínez GF. Cryptococcosis: una alerta necesaria. *Rev Cubana Med Trop*. 2001;53:224-5.
6. Arteaga E, Capó De Paz V, Pérez-Fernández-Terán ML. Micosis oportunistas invasivas en el sida. Un estudio de 211 autopsias. *Rev Iberoam Micol*. 1998;15:33-5.
7. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi*. Baarn/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili; 2009.
8. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 3th Informational Supplement document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
9. Lozano M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2817-22.
10. Gumbo T, Kadzirange G, Mielke J, Gangaidzo IT, Hakim JG. *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis in African children with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21:54-6.
11. Álvarez I, Velázquez JC, Ponce J, Gaya JA. Criptococosis infantil: presentación de 3 casos. *Rev Cubana Med Trop*. 2001;53(1):55-9.
12. Bittencourt C, Orzechowski M, Gazzoni F, Severo LC. Cryptococcosis in children. *Paediatric Resp Reviews*. 2009;10:166-71.

13. Cabañes JE. Micosis y zoonosis: *Cryptococcus* spp. Rev Iberoam Micol. 2008;25:s1-s3.
14. Miglia KJ, Govender NP, Rossouw J, Meiring S, Mitchell TG, and the Group for enteric, respiratory, and meningeal disease surveillance in South Africa. Analyses of pediatric isolates of *Cryptococcus neoformans* from South Africa. J Clin Microbiol. 2011;49:307-14.
15. Casadevall A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? J Clin Invest. 2010;120:1389-92.
16. Fernández CM, Martínez G, Illnait MT, Perurena M, González M. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en aislamientos clínicos cubanos. Rev Cubana Med Trop. 1998;50:167-9.
17. Lin X, Nielsen K, Patel S, Heitman J. Impact of mating type, serotype, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2008;76:2923-38.
18. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2010;50:291-322.
19. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX. Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2011;49:3050-3.

Recibido: 4 de septiembre de 2012.

Aprobado: 11 de octubre de 2012.

María Teresa Illnait-Zaragozí. Laboratorio de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". AP 601. La Lisa. La Habana, Cuba. Teléf.: 53-7-255 3524. Fax: 53-7-336048. Correos electrónicos: mtillnait@ipk.sld.cu; mtillnait@infomed.sld.cu