

AISLAMIENTO DE *Cryptococcus neoformans* EN MUESTRAS DEL MEDIO AMBIENTE DE LOS ESTADOS BOLÍVAR Y ANZOÁTEGUI, VENEZUELA

Cryptococcus neoformans ISOLATION IN ENVIRONMENTAL SAMPLES FROM BOLÍVAR AND ANZOÁTEGUI STATES, VENEZUELA

JULMAN CERMEÑO*, JEAN PIÑERÚA, ROSANNA ZAMBRANO

Universidad de Oriente, Núcleo de Bolívar, Escuela de Ciencias de la Salud "Dr. Francisco Battistini Casalta",
 Departamento de Parasitología y Microbiología, Ciudad Bolívar, Venezuela

*Correspondencia: Julman Cermeño , E-mail: jcerme30@gmail.com

RESUMEN

El complejo *Cryptococcus* spp. está constituido por hongos saprófitos y se encuentra en árboles y aves, siendo su estudio relevante para la región sur oriente del país, dada la prevalencia de la infección que ocasiona. Con el objetivo de identificar especies de *Cryptococcus* aisladas de medios naturales del estado Bolívar y Anzoátegui (Venezuela), se recolectaron 576 muestras de *Eucalyptus camadulensis* presentes en las plantaciones de Productos Forestales de Oriente, C.A. (PROFORCA) Los Hachos, Coloradito y Maripa; 20 muestras aéreas y 50 muestras de excretas de aves comercializadas en Ciudad Bolívar. Todas las muestras fueron sembradas en agar Sabouraud dextrosa cloranfenicol, agar *Guizotia abyssinica*-creatinina y agar *Helianthus annuus*, por duplicado. Las levaduras fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas y asimilación de azúcares mediante el sistema de Api 20C y Api 32C (Biomérieux®), test de resistencia a la actidiona y producción de fenoloxidasas. Los aislamientos identificados como *Cryptococcus* spp., fueron sembrados en medio con L-canavanina glicina azul de bromotimol. Los hongos aislados en las muestras vegetales fueron: *Aspergillus* spp., 75% (n = 432), *Mucor* spp., 9,5% (n = 55) y *Penicillium* spp., en 3,3% (n = 19). *Cryptococcus neoformans* fue aislado en el 0,3% de las muestras de *E. camaldulensis* (n = 2): una muestra de la plantación de PROFORCA Los Hachos y otra de la plantación de Maripa; además, en las excretas de pollos y gallinas (2%). *Cryptococcus neoformans* fue aislado en fuentes ambientales de los estados Bolívar y Anzoátegui, lo cual demuestra la distribución ambiental de dicho patógeno, y contribuye al conocimiento epidemiológico.

PALABRAS CLAVE: Criptococosis, *Eucalyptus camadulensis*, excretas, gallinas, pollos.

ABSTRACT

The *Cryptococcus* spp. complex is a cluster of saprophytic fungi, which is found in trees and birds and its study is relevant for the south-eastern region of the country, given the prevalence of the infection that it can cause. To identify the *Cryptococcus* species in natural environments in Bolívar and Anzoátegui states (Venezuela), 576 samples of *Eucalyptus camadulensis* from plantations of Productos Forestales de Oriente, C.A. (PROFORCA) Los Hachos, Coloradito and Maripa; 20 air samples and 50 excreta samples from poultry commercialized in Ciudad Bolívar, were collected. Samples were cultured in Sabouraud dextrose chloramphenicol agar, *Guizotia abyssinica*-creatinine and agar *Helianthus annuus* by duplicate. Yeasts were identified by biochemical tests and sugars assimilation by Api 20C and Api 32C (Biomérieux®) systems, resistance test to actidione and phenoloxidase production. The isolates identified as *Cryptococcus* spp. were inoculated in L-Canavanine glycine bromothymol blue media. Isolated fungi from plant tissue samples were: *Aspergillus* spp., in 75% (n = 432), *Mucor* spp., 9.5% (n = 55) and *Penicillium* spp., in 3.3% (n = 19). *Cryptococcus neoformans* was isolated from 0.3% of samples (n = 2) from *E. camaldulensis*: a sample from PROFORCA Los Hachos and another from Maripa's plantation; and from chickens and hens excreta samples (2%). This study demonstrate that *Cryptococcus neoformans* was isolated in environmental sources from Bolívar and Anzoátegui states, pointing out the environmental distribution of this pathogen, and contributing to its epidemiological knowledge.

KEY WORDS: Cryptococcosis, *Eucalyptus camadulensis*, excreta, hen, chicken.

INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una enfermedad potencialmente letal, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos (Hagen *et al.* 2015, Kwon-Chung *et al.* 2017, Rajasingham *et al.* 2017, Rakotoarivelo *et al.* 2020). Es causada por levaduras

encapsuladas ambientales que pertenecen al género *Cryptococcus*, incluidos los Complejos de especies *C. neoformans* y *C. gattii* frecuentemente (Hagen *et al.* 2015, Kwon-Chung *et al.* 2017).

Las infecciones por *Cryptococcus* spp., se adquieren de las fuentes ambientales y como consecuencia de la inhalación de blastoconidias o

basidiosporas deshidratadas que van hacia los pulmones del individuo susceptible y de allí puede diseminarse a diferentes órganos y tejidos principalmente pulmones y sistema nervioso central (Lin y Heitman 2006, Temfack *et al.* 2019).

Cryptococcus spp., posee una peculiar distribución geográfica de sus variedades y serotipos, habiéndose encontrado una elevada incidencia de *C. neoformans* en Europa y en el norte de América, mientras que en zonas tropicales o subtropicales, *C. gattii* es el que predomina (Kwong-Chung y Nenett 1984, Cogliati *et al.* 2016). Esta distribución geográfica hace importante el estudio de su hábitat natural, como posible fuente de contacto para individuos susceptibles (Nishikawa *et al.* 2003), tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos, debido a que la transmisión de la infección es a través de fuentes ambientales (Moreira *et al.* 2006, Gugni *et al.* 2020).

Cryptococcus neoformans se ha aislado principalmente de excrementos de paloma (*Columba livia*), en entornos urbanos y suelos (May *et al.* 2016). Además, se ha aislado de varias especies de corteza y los huecos del tronco de los árboles (Ellis y Pfeiffer 1990, 1992, May *et al.* 2016). *C. gattii* ha sido aislado de tejidos vegetales de *Eucalyptus camadulensis*, *Eucalyptus tereticornis* y en más de 10 especies de árboles nativos de la Isla de Vancouver (*Eucalyptus* spp., *Arbutus menziesii*, *Alnus* spp., *Cedrus* spp., *Pseudotsuga* spp., entre otras) (Ellis y Pfeiffer 1992, Kidd *et al.* 2004, MacDougall *et al.* 2007); y se ha podido correlacionar la distribución geográfica de dicho árbol con la incidencia de esta levadura en muestras clínicas (Kwong-Chung y Nenett 1984, Casadevall y Perfect 1998, Quintero *et al.* 2005).

El objetivo de este estudio fue investigar la presencia de especies de *Cryptococcus* de fuentes ambientales: árboles de eucalipto (*Eucalyptus camadulensis*), muestras de aire del ambiente de las plantaciones de eucaliptos de los estados Bolívar y Anzoátegui y, en las excretas de aves de corral de Ciudad Bolívar, estado Bolívar; con la finalidad de contribuir al conocimiento epidemiológico de la infección por *Cryptococcus* spp., en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo y descriptivo. Previa obtención de los permisos de las autoridades competentes, se seleccionaron al azar árboles de *Eucalyptus camadulensis* presentes en las plantaciones de Productos Forestales de Oriente, C.A. (PROFORCA) Los Hachos (latitud: 8°29'58.49"N, longitud: 63°23'0.03"O),

PROFORCA Coloradito (latitud: 8°45'12.10"N, longitud: 63°27'2.51"O) y de las plantaciones de Maripa (Corporación Venezolana de Guayana-CVG) (latitud: 7°23'33.04"N, longitud: 65° 8'48.67"O). Además, 20 muestras aéreas de dichas plantaciones y 50 muestras de excretas de aves (pollos y gallinas) de algunas ventas de aves de corral de varios establecimientos de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela.

Se tomaron muestras vegetales: de la corteza y hojas de los árboles de *Eucalyptus camadulensis*, que se encontraban en estado de descomposición y fueron colocadas en bolsas plásticas de primer uso, con cierre hermético. Las flores no se recolectaron porque no las hubo en el momento del estudio. Las muestras se identificaron y se transportaron al Laboratorio de Parasitología y Microbiología de la Escuela de Ciencias de la Salud "Dr. Francisco Battistini", Universidad de Oriente, Núcleo de Bolívar, estado Bolívar-Venezuela, para su procesamiento.

Las muestras de excretas de aves fueron recolectadas con baja lengua de madera estéril y colocadas en placas de Petri estériles, se sellaron y rotularon; luego se dispusieron en bolsas plásticas de primer uso, con cierre hermético, para su traslado. Cada muestra se dividió en dos porciones. Una porción fue suspendida en solución salina fisiológica con cloranfenicol. Se agitó y se homogeneizó vigorosamente durante 15 minutos, luego, se dejó reposar durante 30 minutos. Del sobrenadante se tomaron 100 µL y se inocularon en Agar Sabouraud Dextrosa Cloranfenicol (SDA) (Himedia®), Agar *Guizotia abyssinica*-creatinina (AGA) y Agar semillas de girasol (*Helianthus annuus*) por duplicado. La otra porción de la muestra, se inoculó directamente en la superficie de los medios de cultivo SDA, AGA y agar semillas de girasol. Todas las placas se incubaron a 35°C ± 2°C durante 4 semanas, siendo revisadas diariamente.

Se expusieron 20 placas de Petri, con SDA, AGA y Agar semillas de girasol, abiertas al aire libre por espacio de diez minutos, para la recolección de muestras aéreas (método de Koch) (Curo *et al.* 2005), en las plantaciones de eucaliptos. Las placas de Petri expuestas al ambiente fueron incubadas a 35°C y observadas diariamente hasta evidenciar crecimiento fúngico o hasta por cuatro semanas.

La observación microscópica directa de las colonias se realizó mediante un microscopio (OLYMPUS®) (10X, 25X y 40X). Los hongos filamentosos se observaron bajo la forma de numerosos filamentos o hifas, a menudo ramificados

o sin septos. Las levaduras se observaron al examen microscópico directo. La identificación de los hongos aislados se realizó mediante las técnicas estándar de laboratorio. Las colonias que no esporularon luego de cuatro semanas de incubación fueron consideradas como *Mycelia sterilia* (Calvo *et al.* 1980, Pitt y Hocking 1997).

Las colonias sospechosas de levaduras se estudiaron observando en primer lugar, su morfología microscópica utilizando tinciones de azul de lactofenol y tinta china. Se aislaron las cepas que presentaron características morfológicas compatibles con *Cryptococcus* spp., sometiéndolas posteriormente a las pruebas de identificación y biotipificación: identificación de la cápsula, prueba de la ureasa, producción de pigmentos (melanina) en agar de semillas de alpiste (*Guizotia abyssinica*) y de girasol (*Helianthus annuus*), crecimiento a 37°C, ausencia de nitrato-reductasa, estudio de asimilación de carbohidratos y nitratos mediante el sistema de Api 20C y Api 32C (Biomérieux®), test de resistencia a la actidiona y producción de fenoloxidasas. Con los resultados que se obtuvieron se adjudicó un biotipo de acuerdo al código correspondiente al sistema comercial Api 20C y 32C respectivamente. Los aislamientos identificados como *Cryptococcus* spp., fueron sembrados en medio con L-Canavanina Glicina Azul de Bromotimol (CGB) (Sigma®) para la diferenciación entre *C. neoformans* y *C. gattii* (Bennet *et al.* 1977, Kwon-Chung *et al.* 1981, Casadevall y Perfect 1998, Moretti *et al.* 2008).

Análisis estadísticos

Se realizó estadística descriptiva, empleando el Programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows versión 21.0.

RESULTADOS

Se recolectaron 576 muestras de tejidos vegetales (hojas y corteza de los tallos) procedentes de 300 árboles de *Eucalyptus camadulensis* pertenecientes a las plantaciones de PROFORCA Los Hachos (n = 103), PROFORCA Coloradito (n = 47) y las plantaciones de Maripa (n = 150). Los hongos aislados más frecuentemente en estas muestras correspondían a los géneros *Aspergillus* spp., en 75% (n = 432), *Mucor* spp., 9,5% (n = 55) y *Penicilium* spp., en 3,3% (n = 19). El género *Cryptococcus* fue aislado en el 0,3% (n = 2) de las muestras analizadas (Tabla 1). Las cepas de *Cryptococcus* spp., fueron aisladas en una muestra procedente de la plantación de eucalipto de PROFORCA Los Hachos y una muestra de la plantación de Maripa. Ambas cepas

fueron aisladas a partir de hojas de los árboles de eucaliptos identificándose *C. neoformans*.

En las 20 placas expuestas al aire en las plantaciones de Eucalipto: PROFORCA Los Hachos (n = 10); PROFORCA Coloradito (n = 5) y las plantaciones de Maripa (n = 5), los hongos aislados fueron *Aspergillus* spp., en 95% (n = 19) y *Mucor* spp., en 5% (n = 1).

En las excretas de pollos y gallinas procedentes de algunas ventas de aves de corral de Ciudad Bolívar (n = 50), se aislaron diversos hongos levaduriformes y filamentosos (Tabla 2). Los más frecuentes fueron del género *Aspergillus* spp. (n = 36; 72%), *Mucor* spp. (n = 4; 8%), *Candida guilliermondii* (n = 3; 6%) y sólo hubo un aislamiento de *C. neoformans* (2%).

Tabla 1. Hongos filamentosos y levaduriformes aislados en plantaciones de *Eucalyptus camadulensis* de los estados Anzoátegui y Bolívar, Venezuela.

Hongos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Aspergillus</i> spp.	432	75,0
<i>Mucor</i> spp.	55	9,5
<i>Penicilium</i> spp.	19	3,3
<i>Madurella</i> spp.	13	2,3
<i>Fonsecae</i> spp.	10	1,7
<i>Cladophialophora</i> spp.	7	1,2
<i>Acremonium</i> spp.	7	1,2
<i>Curvularia</i> spp.	6	1,0
<i>Trichoderma</i> spp.	4	0,7
<i>Exophiala</i> spp.	3	0,5
<i>Scopulariopsis</i> spp.	3	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	0,3
<i>Pacelomyces</i> sp.	1	0,2
<i>Trichophyton</i> sp.	1	0,2
<i>Rhizopus</i> sp.	1	0,2
<i>Mycelia sterilia</i>	2	0,3
Sin crecimiento	10	1,7
Total	576	100,0

Tabla 2. Hongos filamentosos y levaduriformes aislados en excretas de pollos y gallinas de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela.

Hongos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Filamentosos		
<i>Aspergillus</i> spp.	36	72,0
<i>Mucor</i> spp.	4	8,0
<i>Cladophialophora</i> spp.	2	4,0
Levaduras		
<i>Candida guilliermondii</i>	3	6,0
<i>Trichosporon asahii</i>	2	4,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	2,0
<i>Candida famata</i>	1	2,0
<i>Candida albicans</i>	1	2,0
Total	50	100,0

DISCUSIÓN

En este estudio se aisló *C. neoformans* en la materia vegetal en descomposición perteneciente a árboles de *E. camadulensis*, lo que demuestra que este tipo de materia orgánica le provee a esa levadura los requisitos nutricionales básicos, así como de un hábitat idóneo para su desarrollo. Investigaciones como la de Quintero *et al.* (2005), 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).

El aislamiento de *C. neoformans* en arboles de Eucaliptos es similar a algunos estudios previos realizados en Estados Unidos, Brasil y Croacia, donde varios investigadores han señalado la presencia de *C. neoformans* en materia orgánica en descomposición pertenecientes a diferentes especies de árboles, entre ellas de especies de *Eucalyptus*, *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa*, *Terminalia catappa*, *Olea europea*, *Pinus sylvestris* y *Moquilea tomentosa* (Lazéra *et al.* 1996, Litvintseva *et al.* 2005, Ribeiro *et al.* 2006, Pllana-Hajdari *et al.* 2019).

Cryptococcus neoformans ha sido aislado en árboles aborígenes pertenecientes a zonas rurales del Sur de Australia las cuales son áreas endémicas de *C. gattii*. Se ha demostrado una asociación específica entre *C. gattii* y *E. camadulensis*. En esta investigación no se aisló *C. gattii* en ninguna de las muestras de estos árboles, solo se aisló *C. neoformans*. La aparición de *C. gattii* y *C. neoformans* en el medio ambiente parecía coincidir con el florecimiento de los árboles de *E. camadulensis* (Ellis y Pfeiffer 1990, Elhariri *et al.* 2016).

En la presente investigación no se aislaron cepas de *C. gattii* ni *C. neoformans* en las muestras aéreas recolectadas en las cercanías de los árboles de Eucaliptos, a diferencia de otros estudios realizados por Ellis y Pfeiffer (1990) donde se aisló esta levadura. Estos investigadores recolectaron las muestras aéreas, bajo árboles de Eucalipto que estaban floreciendo, demostrándose la presencia de propágulos, los cuales son los transportadores aéreos del hongo. Quizás, ello explique la razón de los resultados demostrados en este estudio, ya que en el momento de la recolección de las muestras aéreas en los árboles no había floración.

Se aisló *C. neoformans* en muestras de excretas de pollos y gallinas para la venta de Ciudad Bolívar, este hallazgo concuerda con varias investigaciones que señalan la asociación entre *C. neoformans* y los excrementos de aves (Emmons 1955, Littman y Schneierson 1959, Bergman 1963, Denton y Di Salvo 1968, Ansheng *et al.* 1993, Castanon y Lopez 1994, Casadevall y Perfect 1998, Gugnani *et al.* 2020). Múltiples estudios sustentan que el excremento de palomas y aves de corral proporciona un ambiente sumamente favorable (alcalino, hiperosmolar, rico en compuestos nitrogenados, creatinina, xantina, urea y ácido úrico) para el desarrollo de *Cryptococcus* (Rosario *et al.* 2008, Gugnani *et al.* 2020).

El aislamiento de *C. neoformans* en los excrementos de pollos y gallinas para la venta al público, es un hallazgo importante; ya que implica que estos establecimientos comerciales son un hábitat propicio para el mantenimiento del hongo en el ambiente y, podría constituir una fuente de infección para quienes frecuentan estos sitios o para los que viven cerca del lugar de venta de estas aves, ya que las excretas se secan y se podrían esparcir las blastoconidias del hongo.

El crecimiento de *Cryptococcus* spp., en las excretas de las aves está relacionado con los niveles de glucosa en el medio. El hecho de que el aislamiento de *Cryptococcus* en el guano de aves marinas no es significativo a menos que el medio sea complementado con glucosa, apoya esta teoría. De allí que *Cryptococcus* tiene predilección por ciertas aves (palomas) dependiendo de la composición de sus excrementos. Estos hallazgos pueden definir claramente el papel del excremento de aves, en la transmisión de *C. neoformans* (Cermeño *et al.* 2006, Nielsen *et al.* 2007). Sin embargo, las aves no adquieren la criptococosis, probablemente porque *C. neoformans* no puede crecer a la temperatura normal de su cuerpo (42°C) (Litvintseva *et al.* 2005).

El aislamiento de *C. neoformans* en muestras de tejido vegetal (hojas) de las plantaciones de *E. camadulensis* de PROFORCA Los Hachos, estado Anzoátegui y en las plantaciones de Maripa (Corporación Venezolana de Guayana), estado Bolívar, y en excretas de aves de corral de Ciudad Bolívar, es un hallazgo importante debido a que sugieren un mayor riesgo de exposición para los habitantes que viven en la zona y demuestra la distribución ambiental de dicho patógeno en los estados mencionados.

AGRADECIMIENTOS

M.Sc. Marisa Gonsalves, Licda. Isabel Hernández, Dr. Gerardo Godoy, MD. Carelis González, Sr. Carmelo Luces, Sr. José Gregorio Álvarez, Ing. Jesús Medina y personal técnico de PROFORCA CVG, quienes colaboraron en la recolección de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSHENG L, NISHIMURA H, TAGUCHI H, TANAKA R, SHAOXI W, MIYAJI M. 1993. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced insulates in China. *Mycopathol.* 124(1):1-5.
- BENNET J, KWON-CHUNG K, HOWARD D. 1977. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 105(6):582-586.
- BERGMAN F. 1963. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in Sweden. *Acta Med. Scand.* 174:651-655.
- CALVO M, GUARRO J, SUÁREZ G, RAMÍREZ C. 1980. Air-borne fungi in Barcelona city (Spain). *Mycopathol.* 71(2):89-93.
- CASADEVALL A, PERFECT J. 1998 *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, pp. 541.
- CASTANON L, LOPEZ R. 1994. Insolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses.* 37(9-10):325-327.
- CERMEÑO JR, HERNÁNDEZ I, CABELLO I, ORELLÁN Y, CERMEÑO JJ, ALBORNOZ R, PADRÓN E, GODOY G. 2006. *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in dove's (*Columbia livia*) excreta in Bolívar State, Venezuela. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48(1):6-9.
- COGLIATI M, D'AMICIS R, ZANI Z, MONTAGNA MT, CAGGIANO G, DE GIGLIO O, BALBINO S, DE DONNO A, SERIO F, SUSEVER S. 2016. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Res.* 16:fow045.
- CURO M, SALINAS M, CASQUERO J. 2005. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de ICA, 2002. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* 22(4):262-266.
- DENTON J, DI SALVO A. 1968. The prevalence of *Cryptococcus neoformans* in various natural habitats. *Sabouraudia.* 6(3):213-217.
- ELHARIRI M, HAMZA D, ELHELW R, REFAI M. 2016. *Eucalyptus* tree: A potential source of *Cryptococcus neoformans* in Egyptian environment. *Int. J. Microbiol.* 2016:4080725.
- ELLIS D, PFEIFFER T. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 28(7):1642-1644.
- ELLIS D, PFEIFFER T. 1992. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Epidemiol.* 8(3):321-325.
- EMMONS C. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg.* 62(3):227-252.
- GUGNANI HC, HAGEN F, MEIS JF, CHAKRABARTI A. 2020. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi in environmental sources in Bonaire (Dutch Caribbean). *Germes.* 10(4):195-200.
- HAGEN F, KHAYHAN K, THEELEN B, KOLECKA A, POLACHECK I, SIONOV E, FALK R, PARNMEN S, LUMBSCH HT, BOEKHOUT T. 2015. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 78:16-48.
- KIDD S, HAGEN F, TSCHARKE R, HUYNH M, BARTLETT K, FYFE M, MACDOUGALL L, BOEKHOUT T, KWON-CHUNG KJ, MEYER W. 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(49):17258-17263.
- KWONG-CHUNG KJ, NENETT JE. 1984. Epidemiologic differences between in two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 120(1):123-130.
- KWON-CHUNG K, POLACHECK I, BENNETT J. 1981. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes

- A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* 15(3):535-537.
- KWON-CHUNG KJ, BENNETT JE, WICKES BL, WIELAND W, CUOMO C, WOLLENBURG K, BICANIC T, CASTAÑEDA E, CHANG YC, CHEN J, COGLIATI M, DROMER F, ELLIS D, FILLER S, FISHER M, HARRISON T, HOLLAND S, KOHNO S, KRONSTAD J, LAZERA M, LEVITZ S, LIONAKIS M, MAY R, NGAMSKULRONGROJ P, PAPPAS P, PERFECT P, VOLKER RICKERTS V, SORRELL T, WALSH T, WILLIAMSON P, XU J, ZELAZNY A, CASADEVALL A. 2017. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere.* 2(1):e00357-16.
- LAZÉRA M, PIRES F, CAMILLO-COURA L, NISHIKAWA M, BEZERRA C, TRILLES L, WANKE B. 1996. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* 34(2):127-131.
- LIN X, HEITMAN J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:69-105.
- LITTMAN M, SCHNEIERSON S. 1959. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *Am. J. Hyg.* 69(1):49-59.
- LITVINTSEVA A, KESTENBAUM L, VILGALYS R, MITCHELL T. 2005. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 43(2):556-564.
- MACDOUGALL LS, GALANIS E, MAK S, LESLIE M, CIESLAK P, KRONSTAD JW, MORSHED MG, BARTLETT KH. 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the pacific northwest, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 13(1):42-50.
- MAY RC, STONE NR, WIESNER DL, BICANIC T, NIELSEN K. 2016. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(2):106-117.
- MOREIRA T, FERREIRA MS, RIBAS RM, BORGES AS. 2006. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39 (3):255-258.
- MORETTI ML, RESENDE MR, LAZÉRA MS, COLOMBO AL, SHIKANAI-YASUDA MA. 2008. Guidelines in cryptococcosis – 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41(5):524-544.
- NIELSEN K, DE OBALDIA A, HEITMAN J. 2007. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: Implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot. Cell.* 6(6):949-959.
- NISHIKAWA M, LAZERA M, BARBOSA G, TRILLES L, BALASSIANO B, MACEDO R, BEZERRA CC, PÉREZ MA, CARDARELLI P, WANKE B. 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J. Clin. Microbiol.* 41(1):73-77.
- PITT J, HOCKING A. 1997. *Fungi and food spoilage.* 2nd Ed. Blackie Academic and Profesional, London, UK, pp. 593.
- PLLANA-HAJDARI D, COGLIATI M, ČIČMAK L, PLEŠKO S, MLINARIĆ-MISSONI E, MAREKOVIĆ I. 2019. First isolation, antifungal susceptibility, and molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* from the environment in Croatia. *J. Fungi (Basel).* 5(4):99.
- QUINTERO E, CASTAÑEDA E, RUIZ A. 2005. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el Departamento de Cundinamarca-Colombia. *Rev. Iberoam. Micol.* 22:93-98.
- RAJASINGHAM R, SMITH RM, PARK BJ, JARVIS JN, GOVENDER NP, CHILLER TM, DENNING DW, LOYSE A, BOULWARE DR. 2017. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect. Dis.* 17(8):873-881.
- RAKOTOARIVELO RA, RABERAHONA M, RASAMOELINA T, RABEZANAHARY A, RAKOTOMALALA FA, RAZAFINAMBININTSOA T, BÉNET T, VANHEMS P, RANDRIA MJD, ROMANÒ L, COGLIATI M, CORNET M, RAKOTO ANDRIANARIVELO M. 2020. Epidemiological characteristics of cryptococcal meningoencephalitis associated with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from HIV-infected patients in Madagascar: A cross-sectional study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14(1):e0007984.

- RIBEIRO A, SILVA L, SCHRANK I, SCHRANK A, MEYER W, VAINSTEIN E. 2006. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from eucalypts in South Brazil. *Med. Mycol.* 44(8):707-713.
- ROSARIO I, ACOSTA B, COLOM F. 2008. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. *Rev. Iberoam. Micol.* 25(Supl):13-18.
- TEMFACK E, BOYER-CHAMMARD T, LAWRENCE D, DELLIERE S, LOYSE A, LANTERNIER F, ALANIO A, LORTHOLARY O. 2019. New insights into *Cryptococcus* spp. biology and cryptococcal meningitis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 19(10):81.