

Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos clínicos de los complejos de especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* en Costa Rica

Cristian Mata-Delgado,¹ Stefany Lozada-Alvarado,² Norma T. Gross,^{1,2} Daniela Jaikel-Viquez.^{1,2,*}

¹Sección de Micología Médica, Departamento de Microbiología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

²Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

Rev Panam Enf Inf 2019; 2(2):58-63.

Received 13 July 2019 - Accepted 3 May 2020.

Copyright © 2020 Mata-Delgado et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Resumen

Introducción: La criptococosis es una infección micótica oportunista causada por levaduras del género *Cryptococcus* spp. Mediante técnicas moleculares se ha logrado establecer que el complejo de especies *C. neoformans* está conformado por dos especies: *C. neoformans* y *C. denoformans* y el complejo de especies *C. gattii* por cinco: *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* y *C. decagattii*. Además, existen híbridos entre las especies. **Métodos:** Se analizaron un total de 36 aislamientos clínicos costarricenses. Los hongos fueron caracterizados fenotípicamente mediante la presencia de cápsula, crecimiento a 37 °C, ureasas y lacasas y crecimiento en agar canavanina, glicina, azul de bromotimol (CGB) y genéticamente mediante la técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) del gen *URA5*. **Resultados:** Todas las levaduras analizadas presentaron cápsula, crecieron a 37 °C, sintetizaron ureasas y lacasas; el 8.34 % ($n = 3$) crecieron en agar CGB. Al analizar los patrones de restricción se encontró que la especie más frecuente fue *C. neoformans* $n = 33$ (91.67 %) (patrón molecular VNI ($n = 22$; 61.11 %) y VNII ($n = 11$; 30.56 %)), seguido de *C. gattii* (VGI) $n = 2$ (5.56 %) y VGIV (*C. tetragattii* o *C. decagattii*) $n = 1$ (2.78 %). **Conclusiones:** se demuestra por primera vez la presencia de los patrones moleculares VGI y VGIV en Costa Rica. Por lo tanto, se recomienda la implementación del medio CGB en los distintos laboratorios clínicos ya que la especie incide en la efectividad del tratamiento.

Palabras Clave: Criptococosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, micosis sistémica, inmunodeficiencia.

Phenotypical and genotypical characterization of Costa Rican clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complex

Abstract

Introduction: Cryptococcosis is a life-threatening mycosis. It is caused by the *Cryptococcus neoformans* species complex (*C. neoformans* and *C. denoformans*) and the *Cryptococcus gattii* species complex (*C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* and *C. decagattii*). **Methods:** In the present investigation, 36 clinical isolates were studied. The isolates were identified by standard methods, such as india ink preparation, growth at 37 °C, urease test, growth on L-dopa and canavanine-glycine-bromothymol blue agar (CGB). The molecular types were assigned by RFLP-*URA5* analysis. **Results:** All isolates produced a capsule, grew at 37 °C, synthesized ureases and melanin. The isolates were identified as *C. neoformans* $n = 33$ (91.67 %) (molecular type VNI ($n = 22$; 61.11 %) and VNII ($n = 11$; 30.56 %)), *C. gattii* (VGI) $n = 2$ (5.56 %) and VGIV (*C. tetragattii*/ or *C. decagattii*) $n = 1$ (2.78 %). **Conclusion:** We demonstrate for the first time the presence VGI and VGIV in Costa Rica and, hence, the circulation of three species belonging to the complexes. Therefore, we recommend the usage of CGB in the clinical laboratories, since the correct species identification has a direct impact on the effectiveness of the treatment.

Key words: Cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, systemic mycosis, immunodeficiency.

Introducción

La criptococosis es una micosis sistémica oportunista, causada por levaduras que pertenecen a los complejos de especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Por lo general, afecta a pacientes inmunosupresos, especialmente a los infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)¹. La infección se adquiere mediante la inhalación de blastosporas encapsuladas que se encuentran en el medio ambiente (deyecciones de palomas, suelos, oquedades de

los árboles y material vegetal en descomposición). El foco de infección inicial son los pulmones y a partir de este sitio puede diseminarse a la piel u otros órganos; sin embargo, el hongo presenta un tropismo marcado por el sistema nervioso central (SNC), por lo que la manifestación clínica más importante es la meningitis^{1,2}.

En los últimos años se han utilizado varias técnicas moleculares para estudiar la epidemiología de estos complejos. Hasta el momento se han descrito un total de siete especies. El complejo de especies *C. neoformans*

está conformado por las especies *C. neoformans* (serotipo A, VNI/AFLP1 y VNII/AFLP1A, AFLP1B, VNB, anteriormente conocido como *C. neoformans* var. *grubii*), *C. deneoformans* (serotipo D, VNIV/AFLP2, anteriormente *C. neoformans* var. *neoformans*) y el híbrido *C. neoformans* × *C. deneoformans* hybrid (VNIII/AFLP3 o híbrido AD). Por otro lado, el complejo *C. gattii* está formado por cinco especies: *C. gattii* (VGI/AFLP4), *C. deuterogattii* (VGII/AFLP6), *C. bacillisporus* (VGIII/AFLP5), *C. tetragattii* (VGIV/AFLP7) y *C. decagattii* (VGIV y VGIIIc/AFLP10).

Los híbridos diploides o aneuploides entre las especies son híbrido *C. deneoformans* × *C. gattii* (AFLP8), híbrido *C. neoformans* × *C. gattii* (AFLP9) e híbrido *C. neoformans* × *C. deuterogattii* (AFLP11)^{3,4}. El patrón molecular más prevalente a nivel mundial es el VNI.

El VNII no ha sido reportado en Europa y en los demás continentes se reporta en porcentajes bajos. Cuando se descubrió el VNB se pensó que este era endémico del Sur de África; sin embargo, se han reportado aislamientos en Brasil⁵. Es importante resaltar que es el segundo patrón molecular en cuanto a frecuencia de aislamiento en África.

El VNIII y VNIV se han encontrado en mayores porcentajes en Estados Unidos y Europa⁶. El patrón molecular del complejo de especies de *C. gattii* más comúnmente aislado es el VGII, siendo el más frecuente en América, seguido del VGI. Este último, es el que más se encuentra en Europa, Asia y Oceanía.

El VGIII no se encuentra en Europa y se aísla en bajos porcentaje, y el VGIV también es raro, ya que solo se ha encontrado en el Sur de África, India y Latinoamérica^{6,7}. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo determinar los patrones moleculares de los complejos de especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* que circulan en Costa Rica para así contribuir con el conocimiento epidemiológico de la enfermedad en el país.

Métodos

Aislamientos

Se trabajó con 36 aislamientos clínicos pertenecientes a la Micoteca de la Sección de Micología Médica, de la Facultad de Microbiología, de la Universidad de Costa Rica. Estos aislamientos se mantuvieron en medio Sabouraud glucosado (MSG) a temperatura ambiente (20 - 30°C).

Caracterización fenotípica de los aislamientos de *Cryptococcus*

A los aislamientos se les realizó una serie de pruebas fenotípicas con el fin de verificar la pureza de los mismos y la correcta clasificación dentro de los complejos *C. neoformans* y *C. gattii*. Se les realizó una tinción negativa con tinta china, fueron incubados a 37 °C, inoculados en agar urea de Christensen, en agar L-dopa y en agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Además, se les realizó una determinación bioquímica con API® 20 C AUX (BioMérieux, Francia).

Caracterización genotípica de los aislamientos de *Cryptococcus*

Se realizó una extracción de ADN genómico mediante la técnica de choque térmico⁸. La tipificación se realizó mediante la técnica de RFLP del gen *URA5*, con las enzimas Sau96I y HhaI (Thermo Scientific, Estados Unidos), utilizando los imprimadores *URA5* (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC 3') y *SJ01* (5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3')⁹. Como controles positivos se utilizaron las cepas de *Cryptococcus* WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNII), 629 (VNIV), WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 161 (VGIII) and WM 779 (VGIV), del *Westmead Institute for Medical Research, Sydney, Australia*.

Resultados

Perfiles demográficos de los pacientes

Los aislamientos fueron depositados en la colección de hongos vivos de la Sección de Micología Médica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica (VI-B7732) entre los años 1969 y 2016. En el Cuadro 1 se presentan los datos demográficos disponibles de estos aislamientos. Cabe resaltar que algunos aislamientos son muy antiguos por lo que no se cuenta con todos los datos.

Caracterización fenotípica de los aislamientos de *Cryptococcus*

En todos los aislamientos estudiados (n = 36) se observó la presencia de cápsula, crecimiento a 37 °C, la hidrólisis de la urea y la producción de melanina; por lo que todos fueron clasificados preliminarmente como *Cryptococcus* spp. y luego como *C. neoformans* según el perfil bioquímico del API® 20 C AUX (BioMérieux, Francia). Mediante el empleo del crecimiento en agar CGB se logró clasificar al 91.66 % (n = 33) de los aislamientos dentro del complejo de especies *C. neoformans* y al 8.34 % (n = 3) dentro del complejo de especies *C. gattii*.

Caracterización genotípica de los aislamientos de *Cryptococcus*

Por medio de la técnica de polimorfismo en la longitud de fragmentos de ADN (abreviada RFLP en inglés) del gen *URA5* se agrupó a los aislamientos en

cuatro patrones moleculares, 22 aislamientos (61,11 %) pertenecen al patrón molecular VNI, 11 (30,56 %) al VNII, 2 (5,56 %) al VGI y 1 (2,78 %) al VGIV (Figura 1 y Cuadro 1).

Cuadro 1. Datos demográficos e información disponible de los aislamientos clínicos costarricenses de los complejos de especies *C. neoformans* y *C. gattii*, analizados (n = 36).

Código	Identificación	Año	Tipo de muestra	Sexo	Edad	Procedencia ¹
CR-NE-04	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1969	ND	ND	ND	Hospital México
CR-NE-07	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	ND	Masculino	ND	Hospital México
CR-NE-08	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	ND	Femenino	ND	Hospital México
CR-NE-09	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	ND	Masculino	ND	Hospital México
CR-NE-10	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	ND	ND	ND	Hospital México
CR-NE-11	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1974	ND	ND	ND	Hospital México
CR-NE-12	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	ND	Femenino	ND	Hospital México
CR-NE-13	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	ND	Masculino	ND	Hospital México
CR-NE-14	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	ND	Femenino	ND	Hospital México
CR-GA-09 (antiguo CR-NE-15)	<i>C. gattii</i> (VGI)	1980	ND	ND	ND	Hospital México
CR-GA-05 (antiguo CR-NE-16)	<i>C. gattii</i> (VGI)	ND	ND	Femenino	ND	Hospital México
CR-NE-17	<i>C. neoformans</i> (VNII)	1987	LCR ³	Masculino	ND	Hospital México
CR-NE-18	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	Úlcera de mano	Masculino	ND	ND
CR-NE-19	<i>C. neoformans</i> (VNII)	ND	ND	ND	8	Hospital Nacional de Niños
CR-NE-24	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1994	LCR	ND	ND	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-01	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1994	ND	ND	ND	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-02	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1994	ND	ND	ND	ND
CR-NE-26	<i>C. neoformans</i> (VNI)	ND	ND	ND	ND	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-NE-28	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1996	ND	ND	ND	Hospital México
CR-NE-29	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1997	ND	ND	ND	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-NE-31	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1997	LCR	ND	ND	Hospital Clínica Bíblica
CR-NE-36	<i>C. neoformans</i> (VNII)	1999	LCR	ND	ND	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-NE-37	<i>C. neoformans</i> (VNII)	1999	ND	Masculino	ND	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-NE-38	<i>C. neoformans</i> (VNII)	1999	ND	ND	ND	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-NE-40	<i>C. neoformans</i> (VNII)	2001	LCR	ND	ND	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-NE-42	<i>C. neoformans</i> (VNII)	ND	LCR	ND	ND	Hospital México
CR-NE-43	<i>C. neoformans</i> (VNII)	2002	LCR	ND	ND	Hospital Blanco Cervantes
CR-NE-124	<i>C. neoformans</i> (VNII)	2016	LCR	Masculino	ND	Hospital William Allen Taylor, Turrialba, Cartago
CR-NE-125	<i>C. neoformans</i> (VNII)	2016	LBA ⁴	Femenino	10	Hospital Nacional de Niños
CR-NE-127	<i>C. neoformans</i> (VNII)	2016	Hemocultivo	Masculino	56	Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia
CR-NE-128	<i>C. neoformans</i> (VNI)	2016	LBA	Femenino	9	Hospital Nacional de Niños
CR-GA-08	<i>C. tetragattii</i> / <i>C. decagattii</i> (VGIV)	2016	LCR	Masculino	41	Hospital México, Cartago

¹Hospital de donde se realizó el aislamiento y/o provincia de residencia del paciente. ²ND=no disponible. ³LCR=líquido cefalorraquídeo.

⁴LBA=lavado bronquioalveolar.

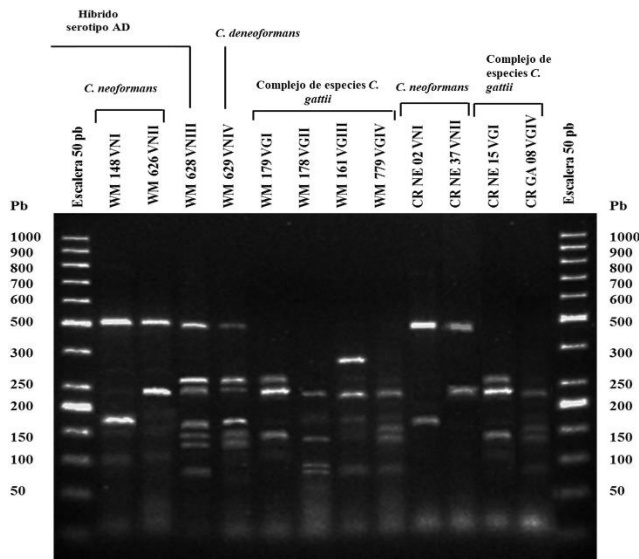
Discusión

La criptococosis se define como una infección oportunista, causada por levaduras pertenecientes a los complejos de especies *C. neoformans* y *C. gattii*. Para el 2013 se estimaba que la meningitis criptocócica causaba

aproximadamente un millón de casos anuales, de los cuales 625 000 morían, principalmente entre la población VIH positiva sin tratamiento antirretroviral ¹⁰. En el presente estudio, se caracterizaron 36 aislamientos clínicos que fueron depositados en la colección de hongos vivos de la Sección de Micología Médica de la

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Como se mencionó previamente, en el apartado de resultados, no se cuenta con toda la información demográfica de los aislamientos, lo que presenta una de las debilidades de este estudio. Sin embargo, desde el 2011 se han hecho esfuerzos para que a la colección se incorporen solo aislamientos que cuenten con la mayor cantidad de información posible y así poder realizar estudios epidemiológicos más robustos ⁹.

Figura 1. Ejemplos de los patrones moleculares de los complejos *C. neoformans* y *C. gattii* detectados según la restricción enzimática del gen URA5. WM = Hospital Westmead. Marcador de peso molecular (GeneRuler 50 pb DNA Ladder, Thermo Scientific®).



La especie *C. neoformans* causa aproximadamente el 80% de los casos de meningitis criptocócica en el mundo. Dicha cifra aumenta en pacientes VIH positivos, llegando a ser los responsables de hasta un 90 % de los casos de meningitis criptocócica. A dicha especie pertenecen los patrones moleculares VNI y VNII ^{3,4,11,12}, ambos encontrados en el presente estudio y en el estudio de Jaikel y colaboradores (2018)⁹; siendo el VNI el más frecuentemente aislado. Dicho patrón molecular se ha encontrado en todos los continentes y es el más común a nivel mundial; excepto en Australia y Papúa Nueva Guinea ⁶. En el continente americano, ha sido aislado a partir de muestras clínicas, humanas y veterinarias, y ambientales en Argentina ¹³, Brasil ¹⁴, Chile, Colombia ¹⁵, Cuba ¹⁶, Ecuador ¹⁷, Estados Unidos ⁶, Guatemala ¹⁵, México ¹⁸, Perú ¹⁹ y Venezuela ¹⁵. Además, presenta una baja diversidad molecular ya que se presenta un claro predominio del alelo del MAT tipo α ¹¹. Suele causar enfermedad en pacientes que se encuentren

inmunosuprimidos debido a infección con VIH, terapia con corticosteroides, malignidades hematológicas o que hayan sufrido un trasplante de órgano; sin embargo, existen casos reportados en individuos inmunocompetentes ^{11,20}.

Los patrones moleculares VNI y el VNII al pertenecer a la misma especie comparten gran parte de sus características epidemiológicas y cabe destacar que todos los aislamientos VNII que se han identificado a nivel mundial son MAT α ¹¹. Este patrón molecular ha sido reportado en todos los continentes, solo que a diferencia del VNI, se suele reportar en bajos porcentajes ⁶. En América se ha reportado en Brasil ¹⁴, Chile, Colombia ¹⁵, Estados Unidos ⁶, México ¹⁸, Perú ¹⁹ y Venezuela ¹⁵.

Por su parte, los organismos que pertenecen al complejo de especies *C. gattii* por lo general, causan infección en individuos inmunocompetentes y están asociados con mayor cantidad de secuelas neurológicas en comparación con *C. neoformans* ^{21,22}. Este complejo se consideraba propio de los trópicos y subtropicales, pero en años recientes se ha reportado en nuevas regiones geográficas como Europa, Canadá, Estados Unidos y Japón ⁷.

Entre los aislamientos estudiados se identificaron dos *C. gattii* (VGI) y un aislamiento VGIV. Este último, podría pertenecer a la especie *C. tetragattii* o *C. decagattii* ya que la técnica molecular empleada no diferencia entre ambas especies. Esta es otra limitante del estudio, por lo que se recomienda, a futuro, realizar estudios de secuenciación para discernir esta diferencia. Esto resulta interesante, ya que según la literatura el patrón molecular del complejo *C. gattii* más comúnmente aislado en América es el VGII^{6,22}. Este patrón ya había sido reportado previamente en Costa Rica ²², por lo que se esperaba encontrarlo en el presente estudio. Cabe destacar que según reportes anteriores el VGI era el patrón molecular más aislado a nivel mundial, es posible que el VGII desplazara al VGI debido al brote de Vancouver, ya que se realizaron múltiples muestreos relacionados con el brote ya mencionado ^{11,23}. Lo anterior se evidencia mejor teniendo en cuenta que entre los aislamientos clínicos ambos genotipos se reportan con porcentajes similares, mientras que en aislamientos ambientales el VGI representa un 26 % y el VGII un 61% del total de aislamientos de este complejo genotipados ^{7,11}.

Dicho brote llamó la atención debido a que fue la primera vez en que se reportaba casos causados por el complejo de especies *C. gattii* en una región de clima templado ²⁴.

C. gattii (VGI) es la segunda especie más frecuentemente aislada a nivel mundial, y la principal especie de este complejo en Europa, Asia y Oceanía⁶. En el continente americano el aislamiento de esta especie no es rara, debido a que además de haberse encontrado en este estudio, también se ha reportado en Argentina¹³, Brasil¹⁴, Canadá²⁵, Colombia¹⁵, Cuba¹⁶, Estados Unidos⁶, México, Perú¹⁵, Puerto Rico²⁶ y Venezuela¹⁵. Esta especie suele causar enfermedad en pacientes inmunocompetentes, característica que comparte con la especie *C. deuterogattii* (VGII)⁷. Sin embargo, ambos genotipos difieren en su presentación clínica, pues una infección con *C. gattii* es más común que genere cuadros a nivel del SNC⁴, mientras que por *C. deuterogattii* suele presentarse más casos pulmonares²⁷.

Por otro lado, *C. bacillisporus* (VGIII), la cual no se encontró entre los aislamientos estudiados, es la tercera especie mayormente aislada del complejo *C. gattii* en el continente americano y se considera endémica del sur de California. Esta especie raramente se reporta en los demás continentes^{6,7} y se ha relacionado con población VIH positiva, a diferencia de las especies del complejo mencionados anteriormente²⁸.

El patrón molecular VGIV es el menos frecuente⁷. Se ha demostrado su presencia en tres países de América, a saber: Colombia, México y Puerto Rico⁶. También, cabe destacar que el VGIV es patrón molecular más comúnmente aislado del complejo *C. gattii* en África^{6,7}. Este patrón molecular, al igual que el VGIII, se ha relacionado con pacientes VIH positivos, principalmente en África²⁹. El VGIV que se aisló en el país provenía del LCR de un paciente VIH positivo que cursaba con una meningitis producto de la infección con el hongo, perfil que calza con el de los aislamientos del sur de África y un aislamiento de la India^{6,29}. En México se ha reportado un aislamiento clínico de VGIV a partir de un paciente inmunocompetente, a la vez que se han reportado aislamientos ambientales de VGIV en Colombia y Puerto Rico^{15,26}.

Finalmente, es importante resaltar que, aunque las micosis sistémicas no son infectocontagiosas, sí constituyen un serio problema de salud pública. La criptococosis, como mencionado anteriormente, es una enfermedad con una alta tasa de mortalidad por lo que es importante que el personal de laboratorio esté capacitado para realizar su diagnóstico de forma rápida y sencilla. En los hospitales de nuestro país no se cuenta con el medio CGB, ni otro medio para diferenciar entre las especies del complejo. Debido a la severidad de la criptococosis, las diferencias ecológicas, de virulencia y de respuesta al tratamiento entre las especies, se sugiere

implementar este o algún otro método para diferenciarlas³⁰.

Agradecimientos

Le agradecemos al Dr. Wieland Meyer y a la Dra. Elizabeth Castañeda, por facilitarnos las cepas control de los Complejos de especies *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. También a la Diplomado Alejandra Gómez Arrieta por todo su apoyo en el laboratorio.

Financiamiento

El proyecto fue financiado por el proyecto 803-B3-001 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Referencias

- Escandón P, de Bedout C, Lizarazo J, Agudelo CI, Tobón A, Bello S, et al. Cryptococcosis in Colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomédica* 2012; 32: 386-98.
- Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 4ta ed. México DF: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2012.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo KR et al. The case for adopting the "Species Complex" Nomenclature for the etiologic agents of Cryptococcosis. *mSphere* 2017;2(1), e00357-16; <https://doi.org/10.1128/mSphere.00357-16>
- Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, POLachek I, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* 2015;78,16-48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>.
- Andrade-Silva LE, Ferreira-Paim K, Ferreira TB, Vilas-Boas A, Mora DJ, et al. Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors. *PlosOne* 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193237>
- Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica* 2013;2013:675213. <https://doi.org/10.1155/2013/675213>
- Chen SC, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4),980-1024. <https://doi.org/10.1128/CMR.00126-13>
- Sosa MA, Rojas F, Mangiaterra M, Giusiano G. Prevalencia de especies de *Malassezia* asociadas a lesiones de dermatitis seborreica en pacientes de Argentina. *Rev Iberoam Micol* 2013; 30: 239-42. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.02.002>
- Jaikel-Viquez D, Uribe-Lorío L, Gross NT. Tipificación molecular y susceptibilidad in vitro frente a fluconazol de aislamientos clínicos costarricenses del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*. *Rev Panam Enf Inf*. 2018;1(1):12-20.
- Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. *PLoS ONE* 2013; 8(3): e60431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060431>
- Heitman J, Kozel TR, Kwong-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. Washington DC, U.S.A.: ASM Press; 2011
- Fang W, Fa Z, Liao W. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. *Fungal Genet Biol*. 2015;78,7-15. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.017>
- Refojo N, Perrotta D, Brudny M, Abrantes R, Hevia AI, Davel G. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Med Micol*. 2015; 47,177-184. <https://doi.org/10.1080/13693780802227290>
- Trilles L, Fernandez-Torres B, dos Santos M, Wanke B, Guarro J. In Vitro Antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10),4815-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4815-4817.2004>

15. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, IberoAmerican Cryptococcal Study Group. 2003. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:189-95.
16. Illnait-Zaragozi MT, Martinez-Machin GF, Fernandez-Andreu CM, Perurena-Lancha MR, Hagen F, Meis J. *Cryptococcus* and cryptococcosis in Cuba. A minireview. *Mycoses*. 2014;57, 707-17. <https://doi.org/10.1111/myc.12275>
17. Sánchez S, Zambrano D, García M, Bedoya C, Fernández C, Illnait-Zaragozi MT. Caracterización molecular de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* de pacientes con HIV, Guayaquil, Ecuador. *Biomédica*. 2017; 37, 425-30.
18. Olivares LR, Martinez KM, Cruz RM, Rivera MA, Meyer W, Espinoza RA, et al. Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Med Mycol*. 2009;47, 713-21.
19. Bejar V, Tello M, Garcia R, Guevara JM, Gonzales S, Vergaray G, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* strains collected from a single institution in Lima, Peru. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2), 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.01.005>
20. Chan M, Lye D, Win MK, Chow A, Barkham T. Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis in Singapore: predominance of *Cryptococcus neoformans* compared with *Cryptococcus gattii*. *Int J Infect Dis*. 2014;26:110-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.019>
21. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Micol*. 2011;39, 155-68.
22. Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* Species Complex. *Australian Biochemist* 2010; 41(1): 12-6.
23. Ngamskulrunroj P, Gilgado F, Faganello J, Litvintseva AP, Leal AL, Tsui KM, Mitchell TG, Vainstein MH, Meyer W. 2009. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PLOS ONE*. 2009;4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005862>
24. Galanis E, MacDougall L, Kidd S, Morshed M. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(2), 251-7. <https://doi.org/10.3201/eid1602.090900>
25. Bartlett KH, Cheng P, Duncan C, Galanis E, Hoang L, Kidd S, Lee M, Lester S, MacDougall L, Mak S, Morshed M, Taylor M, Kronstad J. A Decade of Experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. *Mycopathologia*. 2012;173, 311-9. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9475-x>
26. Loperena- Alvarez Y, Ren P, Li X, Bopp DJ, Ruiz A, Chatuverdi V, Rios-Velazquez C. Genotypic Characterization of Environmental Isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. *Mycopathologia*. 2010;170:279-85. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9296-3>
27. Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wöhrle R, Lee S, Smelser C, Park B, Chiller T. *Cryptococcus gattii* in the United States: Clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clin Infect Dis*. 2011;53(12),1188-95. <https://doi.org/10.1093/cid/cir723>
28. Byrnes EJ, Li W, Ren P, Lewit Y, Voelz K, Fraser JA, Dietrich FS, et al. A Diverse Population of *Cryptococcus gattii* Molecular Type VGIII in Southern California HIV/AIDS Patients. *PLOS Pathog*. 2011;7(9)e1002205. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002205>
29. Litvintseva AP, Thakur R, Reller LB, Mitchell TG. Prevalence of Clinical Isolates of *Cryptococcus gattii* Serotype C among Patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis*;2005;192(5), 888-92.
30. McTaggart L, Richardson SE, Seah C, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX. 2011. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical test, differential media and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7), 2522-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00502-11>.

Autor Corresponsal: Daniela Jaikel Víquez. Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica. Apartado postal: 905-3000, Heredia, Costa Rica. Teléfono (506) 8832-9008/ (506) 2511-8624. E-mail: daniela.jaikelviquez@ucr.ac.cr

Conflictos de Interés: Ninguno.