

ARTICULO

# GENOTIPOS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP Y SU COMPORTAMIENTO COMO BIOPELÍCULAS

## AUTORES

Simón Federico, Uriel Nicolás<sup>1-2</sup>; Sobrado Eugenia Pía<sup>1-2</sup>; Velázquez Nieva Melina<sup>1-2</sup>; Petruszynski Julieta<sup>1-2</sup>; Quinteros Mirta<sup>1</sup>, Farinati Alicia<sup>1-2</sup> y Santiso Gabriela<sup>1-3-4</sup>

1. Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, CABA, Argentina.

2. Cátedra extracurricular de Biopelículas, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, CABA, Argentina.

3. Unidad Micología, Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, CABA, Argentina.

4. ORCID: 0000-0001-7431-1571

CORRESPONDENCIA: santisogabi@gmail.com

<https://doi.org/10.55634/1.5.1>

## RESUMEN

En el complejo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* se reconocen ocho genotipos: VNI y VNII (*C. neoformans* var. *grubii*), VNIII (*C. neoformans* híbrido AD), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*) y genotipos VGI, VGII, VGIII y VGIV de la especie *C. gattii*. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad de los diferentes genotipos para la formación de biopelículas (BP) y evaluar técnicas tintoriales para su demostración. Para ello, se efectuaron Genotipado: se realizó mediante PCR-RFLP. Con cada cepa se estudió la dinámica de formación de BP in vitro, con un dispositivo de vidrio (DV) como soporte abiótico en caldo Sabouraud. Se extrajeron a las 24, 48, 72 horas, y en algunos a la semana. Se emplearon dos coloraciones: nigrosina y cristal violeta, se observaron con microscopio óptico y se aplicó el puntaje utilizada por nosotros. Los resultados fueron de 4, 3 y 1 a las 24 horas; de 5, 3 y 4 a las 48 horas y de 4, 3 y 4 a las 72 horas para VNI, VNII y VNII respectivamente. Puntuación: 1, 2 y 1 a las 24 horas; 2, 2 y 1 a las 48 horas y 1,1 y 1 a las 72 para el complejo *C. gattii*, VGI, VGII y VGIII respectivamente. A la semana, la puntuación fue de 5 para VNI y 3 para VGI. Así, se arribó a las siguientes conclusiones: el genotipo VNI fue el que formó la BP más vigorosa y su presencia en meningitis especialmente en personas viviendo con VIH podría explicar algunos fracasos terapéuticos.

PALABRAS CLAVE: *Cryptococcus* spp Biopelícula, Puntaje

## RESUMO:

Oito genótipos são reconhecidos no complexo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii*: VNI e VNII (*C. neoformans* var. *grubii*), VNIII (*C. neoformans* híbrido AD), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*) e genótipos VGI, VGII, VGIII e VGIV da espécie *C. gattii*. O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade dos diferentes genótipos para a formação de biofilmes (BP) e avaliar técnicas de coloração para sua demonstração. Para isso, foi realizada a Genotipagem, por meio de PCR-RFLP. A cada cepa foi estudada a dinâmica de formação de BP in vitro, com um dispositivo de vidro (DV) como suporte abiótico em caldo Sabouraud. Eles foram extraídos em 24, 48, 72 horas e, em alguns casos, uma semana. Foram utilizados dois corantes: nigrosina e cristal violeta, observados ao microscópio óptico e aplicado o escore utilizado por nós. Os resultados foram 4, 3 e 1 em 24 horas; 5, 3 e 4 às 48 horas e 4, 3 e 4 às 72 horas para VNI, VNII e VNII, respectivamente. Pontuação: 1, 2 e 1 em 24 horas; 2, 2 e 1 às 48 horas e 1,1 e 1 às 72 horas para o complexo *C. gattii*, VGI, VGII e VGIII, respectivamente. Na semana, o escore foi 5 para VNI e 3 para VGI. Assim, chegou-se às seguintes conclusões: o genótipo VNI foi o que formou o PB mais vigoroso e sua presença na meningite, principalmente em pessoas vivendo com HIV, poderia explicar algumas falhas terapêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptococcus* spp Biofilm Score

## INTRODUCCIÓN:

La criptococosis es una micosis oportunista de distribución mundial, cuyas primeras descripciones clínicas datan de 1894-18951. La enfermedad es causada por levaduras del género *Cryptococcus*: complejo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii*.

Dentro de este complejo se reconocen cinco serotipos (A, B, C, D, y el híbrido AD) y ocho genotipos: VNI y VNII (*C. neoformans* var. *grubii*), VNIII (*C. neoformans* híbrido AD), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*) dentro de *C. neoformans* y genotipos VGI, VGII, VGIII y VGIV que corresponden a la especie *C. gattii* (Tabla 1)<sup>2,3</sup>.

La población inmunodeprimida tiene mayor riesgo de padecer la enfermedad: pacientes VIH positivos, esplenectomizados, pacientes con enfermedades linfoproliferativas, corticoterapia, trasplantados y/o desnutridos<sup>4,5</sup>.

Estas levaduras capsuladas ingresan al organismo por vía inhalatoria, que desencadena una infección pulmonar primaria que en caso de no ser erradicada puede diseminarse a vísceras, piel y/o SNC, que es su principal diana.

También puede generar una infección subclínica y/o latente que se reactiva años más tarde en caso de inmunodepresión debido a una real autoinfección<sup>6,7,8</sup>.

Otras vías de contagio documentadas son por contigüidad -criptococosis cutánea- y oral -criptococosis digestiva-<sup>9,10</sup>.

*C. neoformans* se encuentra distribuido globalmente, su principal reservorio es el guano de aves, mientras que *C. gattii*, se encuentra en climas tropicales y subtropicales, y se asocia a distintos árboles tales como el Eucaliptus<sup>11</sup>. (Tabla 1).

*Cryptococcus* spp, al igual que la mayoría de los microorganismos, es capaz de formar BP, su principal modo presentación en el ambiente (80%) como en las infecciones (65%)<sup>12, 13, 14</sup>. Esta es considerada como un importante factor de virulencia, favorece el intercambio genético, la resistencia antifúngica y la evasión inmune. Además constituyen un factor de sobrevivencia en el ambiente como en el ser humano<sup>15,16</sup>.

La criptococosis se puede diagnosticar mediante diferentes métodos como la tinción negativa o tinción de tinta china, que tiñe toda la preparación excepto la cápsula y permite hacer un diagnóstico presuntivo de criptococosis. La sensibilidad de la tinción oscila entre el 25-50% en los casos de meningitis, aunque en los pacientes con sida puede ser mayor.

También se usa la coloración de Giemsa(CG).

Existen otras tinciones usadas en histopatología, como la de la metenamina-plata o la del ácido peryódico de Schiff (PAS), que permiten la identificación por el tamaño y la gemación con base estrecha.

El cultivo e identificación que se efectúa por los métodos

convencionales de asimilación y fermentación de azúcares, requieren hasta 14 días de incubación.

Alternativamente pueden utilizarse sistemas comerciales automáticos o semiautomáticos. La detección del antígeno capsular por una técnica de látex, que es útil en las muestras de suero, LCR, orina e incluso en muestras respiratorias, tiene alta sensibilidad y especificidad y está comercializada, pero hay que ser cautos en su interpretación.

Por último se puede recurrir al diagnóstico molecular.

En la práctica médica se utilizan CG y tinta china para el diagnóstico clínico, mientras que en las prácticas de laboratorio e investigación se pueden utilizar la coloración de Gram, gram, cristal violeta y nigrosina<sup>9</sup>.

## OBJETIVO:

Estudiar la capacidad de diferentes genotipos de *Cryptococcus* para la formación de BP y evaluar diferentes técnicas tintoriales para su demostración.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

Es un estudio descriptivo correlacional.

**Cepas:** Se utilizaron 6 cepas de *Cryptococcus* spp remitidas por el servicio de micología del Hospital F. J Muñiz (CABA) previamente genotipificadas.

Para el mismo se utilizó PCR-RFLP mediante la amplificación del gen URA5 seguido de digestión enzimática por Sau 96I y Hha I.

Los patrones de RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica) se asignaron por comparación a los estándares obtenidos de cepas de referencia (*C. neoformans* var. *grubii*: CBS 10085 VNI and CBS 10084 VNII; *C. neoformans* hybrid AD: CBS 10080 VNIII; *C. neoformans* var. *neoformans*: CBS 10079 VNIV; and *C. gattii*: CBS 10078 VGI; CBS 10082 VGII; CBS 10081 VGIII and CBS 10101 VGIV)

**Biopelícula:** Las 6 cepas genotipificadas se subcultivaron en caldo Sabouraud (SB).

Los cultivos se agitaron para su homogeneización.

Se incubaron por 48 horas; al cabo de las cuales se tomaron 100 uL de cada uno y ambos se inocularon en dos tubos de SB con DV como superficie abiótica en su interior. La incubación se efectuó durante 24, 48, 72 horas y en 2 casos 1 semana.

Finalizado el tiempo de incubación dispuesto para cada uno, se retiraron los DV en forma estéril, se lavaron con agua estéril y se limpiaron con papel de filtro uno de los lados del mismo.

Posteriormente se fijaron mediante sollamado y se colorearon: uno con CV (al 0,5%) y el otro con nigrosina (al 10% de concentración) (Figura 1).

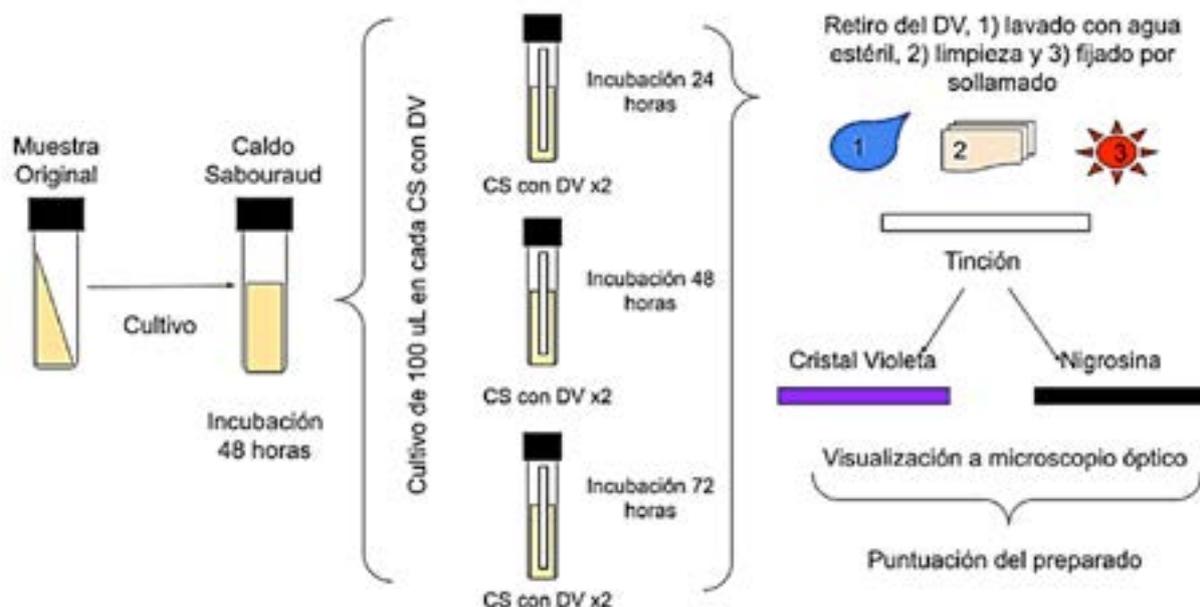


Fig. 1: Procesamiento de las muestras. VGII y VNII se cultivaron también por 1 semana.

Se utilizó el microscopio óptico (MO) para la observación de las mismas.

Se les asignó un "score"/ puntaje a las biopelículas.

Este toma en cuenta la cantidad de células acumuladas por campo de 1000x, atribuyendo un puntaje entre 1 y 5 (Fig. 2).

**Recolección de datos:** Cámara fotográfica y "Google apps for work".

## RESULTADOS:

### Dinámica de crecimiento BP:

Los DV de cada cepa se extrajeron a las 24, 48 y 72 horas después de su incubación a 36,5 °C durante 48 horas de incubación. Esto mismo se efectuó después de una semana de cultivo con los genotipos VNII y VGII.

**Observación microscópica:** Se aplicó el puntaje utilizado en trabajos anteriores (Tabla 2).

A las 24 horas se observó que los genotipos VNI, VNII y VNIII dieron una puntuación de 4, 3 y 1; de 5, 3 y 4 a las 48 horas y 4, 3 y 4 a las 72 horas.

Con los genotipos VGI, VGII y VGIII las puntuaciones fueron 1, 2 y 1 a las 24 horas; 2, 2, 1 a las 48 horas y 1, 1 y 1 a las 72 horas.

A la semana VNII y VGII obtuvieron un puntaje de 5 y 3 respectivamente (Figura 4).

En la mayoría de los genotipos se observó que las BP disminuían su formación a las 72 horas pero se incrementaron a los 7 días en VGII y VNII. Se evidenció además la formación de hifas en el VGI a las 48 horas.

**Selección de tinción:** En la Figura 2 y 3 se observan las

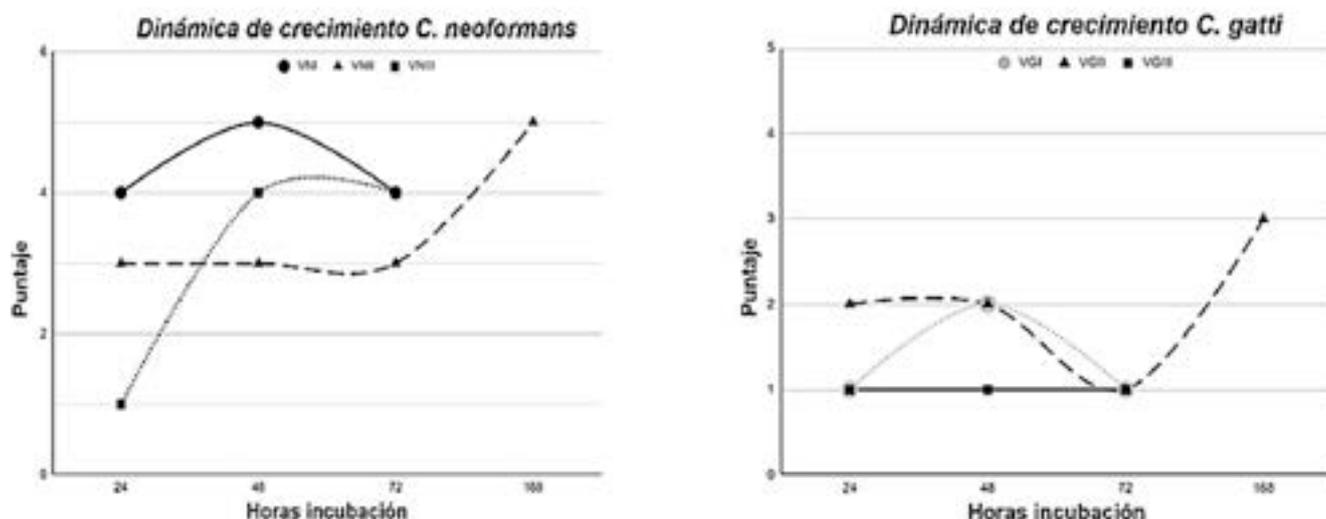


Fig. 2: Cantidad de células acumuladas por campo de 1000x.

BP teñidas con CV y nigrosina respectivamente. No hubo diferencias al comparar los puntajes de las tinciones.

La nigrosina permitió la visualización de las levaduras como “esferas blancas rodeadas por un halo, correspondiendo a la cápsula”, la tinción con CV no permite su visualización. Debido a la capacidad de resaltar la cápsula, se eligió utilizar la primera por sobre la segunda.

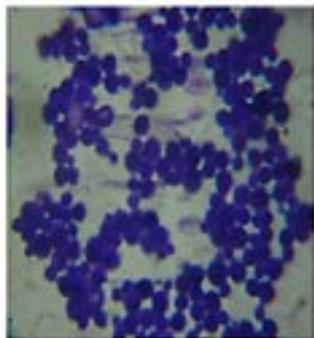


Figura 2. preparado por tinción de color de CV 48 hrs

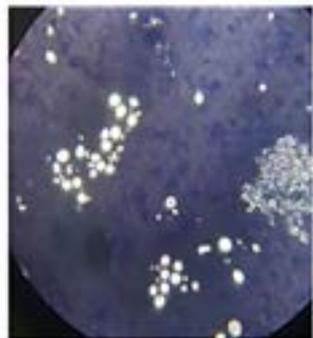


Figura 3. preparado por tinción de color de Nigrosina 48 hrs

## DISCUSIÓN:

La criptococosis es una enfermedad, que durante las últimas décadas ha aumentado su prevalencia, en forma concomitante con el incremento de las enfermedades inmunodepresoras, principalmente la pandemia de VIH desde la década de los 80' y pasó de ser una enfermedad ocasional, con 300 casos anuales a una emergencia sanitaria con aproximadamente 1 millón de casos por año <sup>8,17</sup>.

El diagnóstico de las enfermedades se realiza mediante estudios convencionales <sup>9, 17, 18</sup>.

En cuanto a las tinciones, las más utilizadas para diagnosticar la presencia de *Cryptococcus* spp en muestras clínicas son la tinta china y CG.

Sin embargo, para el estudio de las BP pudimos comprobar que la nigrosina resultó ser más efectiva en comparación con la de CV, técnica utilizada de rutina para el estudio de las BP <sup>19</sup>. La nigrosina se eligió porque resalta la presencia de la cápsula de la levadura, principal factor de virulencia del patógeno.

Facilita la visualización y diferenciación con otros patógenos levaduriformes.

Esto se debe al carácter hidrofóbico de la solución, ya que la cápsula al estar compuesta por polisacáridos, tiene carácter hidrofílico que impide la penetración de la nigrosina <sup>9,20</sup>.

Otra de las ventajas de la coloración sería la evaluación del comportamiento de la cápsula según horas de cultivo y genotipos de *Cryptococcus*, arista interesante para investigar en un futuro.

Las BP son comunidades sésiles de microorganismos adheridas a una superficie y embebidas en un exopolímero que disminuye la penetración de los fármacos, anticuer-

pos y moléculas del complemento <sup>12, 15, 16</sup>.

En el caso de esta levadura, impide el sinergismo teórico entre el antimicótico y anticuerpos, dando lugar un antagonismo entre ambos <sup>12, 21</sup>.

El tratamiento antimicrobiano requiere el abordaje adecuado del fármaco al microorganismo que es negado por la BP.

Además de este importante factor de resistencia, existen estructuras que bloquean su actividad, lo que se repite con los anticuerpos. Recordemos que la cápsula es un importante factor de patogenicidad tal como ocurre en las bacterias capsuladas.

*Cryptococcus* spp posee una cápsula rica en polisacáridos como galactoxilomanano y manoproteínas pero el glucuronoxilomanano (GXM) es el principal componente de la cápsula y blanco de los anticuerpos y proteínas del complemento <sup>21,22</sup>.

Varía su porosidad según la distancia a la pared celular, siendo mayor hacia externo y menor hacia interno.

Esto es lo que dificulta la penetración de moléculas grandes, como las mencionadas previamente <sup>23</sup>.

La síntesis aumenta durante las infecciones y es más delgada en las formas saprófitas <sup>22</sup>.

En cuanto a factores de resistencia antimicrobiana de este género, la presencia de melanina en su pared la cual disminuye el accionar de la anfotericina B y la caspofungina <sup>12, 16, 22</sup>.

Todos estos factores interferirían en la terapéutica adecuada, que es de vital importancia en patologías infecciosas graves.

En nuestro país se suele utilizar la anfotericina B como monoterapia para criptococosis, o en combinación con fluconazol durante la inducción del tratamiento.

Lamentablemente la falta de importación y manufacturación de flucitosina dificulta otro tipo de combinación <sup>17, 24</sup>.

La anfotericina B posee una mala penetración en la barrera hematoencefálica, tan solo atraviesa un 4% de la concentración plasmática <sup>25</sup>.

La presencia de BP bloquearía aún más la penetración de la misma, al igual que la de otros fármacos como los azoles y la caspofungina.

Según varios autores las CIM para la anfotericina B y caspofungina aumenta en 4 a 8 veces, mientras que los azoles como el fluconazol y voriconazol no demostraron efecto alguno sobre las mismas <sup>24,25</sup>.

El aumento de la CIM, va acompañado con el mayor riesgo de efectos adversos como la hipokalemia, nefrotoxicidad y anemia <sup>17</sup> que puede obligar a abandonar el tratamiento y seleccionar otras alternativas.

En los casos de meningoencefalitis la reducción del tiempo de esterilización del LCR es importante ya que reduce el tiempo de internación y el riesgo de adquisición de en-

fermedades nosocomiales.

Vale la pena recalcar la importancia de las infecciones latentes a nivel pulmonar por este microorganismo, adquiridas principalmente en la infancia 26, ya que se documentó que la criptococosis proveniente de este foco presentan mayor resistencia al formar células titánicas, (que son células gigantes poliploides, con gran pared) aisladas o en BP.

En ellas hay constante intercambio genético que suma a la exposición por años a antifúngicos la selección de levaduras resistentes a los mismos <sup>6,7</sup>.

En este trabajo se intentó conocer la capacidad de formar BP de aislamientos de *Cryptococcus* spp previamente genotipificados.

Según se expresó una vez efectuado el diagnóstico es necesario establecer el tratamiento antimicótico adecuado que puede fallar, pero no se conoce con certeza el porqué de este fracaso. Esto podría deberse a la formación de BP.

Según nuestros resultados, las cepas de *C. neoformans* obtuvieron mayor puntaje a los de *C. gatti*, siempre superiores a 3, por lo que estarían en condiciones de formar BP más robustas, con la consiguiente posibilidad del fracaso terapéutico.

*C. gatti* debe poseer otros factores de virulencia que favorezcan la infección, al tener un déficit en la adhesión y/o formación de BP cuando se lo compara con *C. neoformans*. Esto explicaría además, el porqué de la notificación de más casos de meningoencefalitis por *C. neoformans* que por *C. gatti*.

El conocer con precisión el genotipo de *Cryptococcus* recuperado de una infección y su capacidad de formar BP, podría predecir la evolución y pronóstico de la terapia en pacientes VIH positivos.

Este fue uno de los objetivos iniciales que debido a la aparición de la pandemia no se pudieron concretar.

Además hacen falta más estudios con antimicóticos que tengan mayor penetración BP, tal como se demostró con la anidulafungina ante *C. albicans* <sup>27</sup>.

Conclusión, *C. neoformans* es un patógeno oportunista con factores de virulencia importantes entre los cuales debemos mencionar sin duda su capacidad de formar BP. Como quedó demostrado la genotipificación o por lo menos el empleo de técnicas que permitan una identificación más precisa del aislamiento, incluyendo la formación de BP a partir de muestras clínicas, sería necesario para el éxito de la terapia antimicótica.

**BIBLIOGRAFÍA:**

1. Sanfelipe F Contributio alla morfologiae biologia dei blastomiceti che sviluppano nei succhi di alaini frutti Ann Igiene 1894; 4:463-495
2. Tyler KR, Revie NM, Fu C, Robbins N, Cowen LE. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Jul;19(7):454-466. doi: 10.1038/s41579-021-00511-0. Epub 2021 Feb 8. PMID: 33558691; PMCID: PMC7868659.
3. Escandon, Patricia and Montilla, Andrés. Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. *Infect.* [online]. 2010, vol.14, suppl.2 [cited 2022-09-18], pp.127-130. Available from: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922010000600005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922010000600005&lng=en&nrm=iso)>. ISSN 0123-9392.
4. Singh N,F.Dromer, JR Perfect and O Lorholary. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients: current state of the science. *Clin.Infect Dis* 2008; 47:1321-1327
5. Saha DC, Goldman DL, Shao X, Casadevall A, Husain S, Limaye AP, Lyon M, Somani J, Pursell K, Pruett TL, Singh N. Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Dec;14(12):1550-4. doi: 10.1128/CVI.00242-07. PMID: 17959819; PMCID: PMC2168388.
6. Zafar H, Altamirano S, Ballou ER, Nielsen K. A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol.* 2019; 52:158-164. doi: 10.1016/j.mib.2019.11.001. PMID: 31765991; PMCID: PMC6941473.
7. May, R., Stone, N., Wiesner, D. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 106–117. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>
8. Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast.* 2014; 31:47-60. doi: 10.1002/yea.2997. Epub 2014 Jan 19. PMID: 24375706; PMCID: PMC3938112.
9. Estrella Martín-Mazuelos, Anastasio Valverde-Conde Criptococosis. Diagnóstico microbiológico y estudio de la sensibilidad in vitro SEIMC <https://www.seimc.org> > ccs > micología > cripto
10. Delgado W. Oral Cryptococcosis *JSM Trop Med Res* 2017; 2:1015-1017
11. Inmaculada Rosario. “La paloma y otras aves como reservorios de *Cryptococcus* spp.”. *Revista Iberoamericana de Micología* 2008, 25: S13-S18.
12. Martinez LR, Casadevall A. 2015. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Spectrum* 3:MB-00062014. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0006-2014.
13. Robertson E J and A Casadevall Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:2528-2533
14. Sailer M and E vanNieuwenhuijzen Forming of a functional biofilm on Wood surfaces *Ecol Eng* 2010; 36: 163-167 doi:10.1016/j.ecoleng.2009.02.004
15. Ramage G, R Ragendran, L Sherry, C Williams Fungal biofilm resistance *Int J Microbiol* 2012; 528521
16. Farinati A 2021 Resistencia de las biopelículas a los biocidas y anticuerpos. En *Biopelículas en acción-La web microbiológica*; Ed. Ascune pag 37-43
17. Martinez LR, Casadevall A. 2005. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*2006; 50: 1021-1033. doi:10.1128/AAC.50.3.1021-1033.
18. Guidelines For The Diagnosis, Prevention And Management Of Cryptococcal Disease In Hiv-Infected Adults, Adolescents And Children Supplement To The 2016 Consolidated Guidelines On The Use Of Antiretroviral Drugs For Treating And Preventing HIV Infection, 2018
19. Farinati A 2021. Estudio de las biopelículas . Técnicas simples y complejas. Análisis . En *Biopelículas en acción-La web microbiológica*; Ed. Ascune pag 45-51
20. Guilhem J and T L Doering 2011 Byosynthesis and genetics of the *Cryptococcus* capsule. En *Cryptococcus :from Human Pathogen to Model Yeast.* Ed J .Heilman et al ASM Press Washington , pag 27-41
21. Martinez LR, Christaki E, Casadevall A. Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* glucurunoxylomannan antagonizes antifungal drug action against cryptococcal biofilms in vitro. *J Infect Dis.* 2006 Jul 15;194(2):261-6. doi: 10.1086/504722. Epub 2006 Jun 14. PMID: 16779734.
22. Hansong Ma and Robin C. May, “Virulence in *Cryptococcus* Species Advances in Applied Microbiology, 2009, Chapter 5, Elsevier Inc.,.
23. Eisenman HC , JD Nosanchuck, JB Weber, RJ Emerson , TA Camesano and A Casdevall Microstructure of cell wall associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* *Biochemistry* 2003; 44: 3683-3693
24. Messina FA, Maiolo E, Negroni R, Arechavala A, Santiso G, Bianchi M. Alternativas terapéuticas de la criptococosis meníngea. *Actualizaciones en SIDA e Infectología* 2015; 88:25-32. <https://infectologia.info/revista/88/alternativas-terapeuticas-de-la-criptococosis-meningea/>
25. Al Jafari, Abdel Hadi Determination of Amphotericin B levels in cerebrospinal fluid in a patient infected with H.I.V. with Cryptococcal meningitis by High Performance of Liquid Chromatography (HPLC). . (2016). 10.13140/RG.2.1.5183.6563.
26. Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, Pirofski La, Niang R, Casadevall A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics.* 2001;107:E66. doi: 10.1542/peds.107.5.e66. PMID: 11331716.
27. Actividad de anidulafungina (ANF) frente a biopelículas de *Candida* spp urogenitales: ¿ una solución a futuro? M.Marqués, R.Villanueva; A.Farinati *Pren. Med. Argent.* 2014; 100:215-220