

DETECCION DE ANTIGENO DEL POLISACARIDO CAPSULAR DE *Cryptococcus neoformans* EN PACIENTES CON SIDA Y NEUROCRİPTOCOCOSIS EN SÃO PAULO, BRASIL(1).

B. CALVO(2), O. FISCHMAN(2), A. CASTELO FILHO(2), J. REIS FILHO(2),
R. DEL BIANCO(3), R.M. BARBOSA(4) & L. ZAROR(2).

RESUMEN

Antígeno del polisacárido capsular (Ag PC) de *Cryptococcus neoformans* fue detectado por la técnica de aglutinación de latex (AL) en LCR y suero de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y primer episodio de neurocriptococosis, usando como patrón el examen micológico (examen directo y cultivo) de LCR. Se obtuvo una sensibilidad del 100% de AL para detectar AgPC de *C. neoformans*, el cual por su rapidez permite tratamiento específico precoz. Títulos iniciales de AgPC de la levadura en esos pacientes pueden ser > 1.000.000, pareciendo que cuando esos títulos están presentes en suero, se relacionan con mortalidad durante el tratamiento. En los pacientes que sobrevivieron se observó que el examen micológico directo y AgPC de *C. neoformans*, en LCR y suero, permanecen positivos aún después de tratamiento y mejoría clínica del paciente.

UNITERMOS: *Cryptococcus neoformans*; Antígeno del polisacárido capsular; SIDA; Neurocriptococosis.

INTRODUCCION

Criptococosis es una micosis sistémica, cuya forma clínica más diagnosticada es neurocriptococosis; el diagnóstico es realizado por examen micológico de líquido cefalorraquídeo (LCR) y/o detección del antígeno del polisacárido capsular (Ag PC) de *Cryptococcus neoformans*.

En pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la sensibilidad de la técnica de aglutinación de partículas de latex (AL) para detectar Ag PC en LCR y suero ha sido reportada entre 91% y 100% de los casos de Criptococosis^{4, 10, 21, 23}.

Con relación a los factores predisponentes de mortalidad, también en SIDA y Criptococosis ha sido observado que títulos iniciales de Ag PC, en LCR y suero, son significativamente más altos en quienes murieron que en quienes sobrevivieron²³.

Tomando en cuenta que la incidencia de Criptococosis en pacientes con SIDA en Sao Paulo, ha sido encontrada en 11% de los casos², y en 26% de las autopsias^{5, 6}, además, que hasta ahora en nuestro medio no es usado, comunmente, la detección de Ag PC por AL, a pesar de su valor diagnóstico y pronóstico²³ decidimos realizar un estudio con el objetivo de evaluar la sensibilidad de la técnica de AL para detectar Ag PC en LCR y suero de pacientes con SIDA y neurocriptococosis, usando como patrón el examen micológico, así como también su importancia en el diagnóstico de la micosis en ese grupo.

MATERIAL Y METODOS

Población

Se estudiaron 26 pacientes, 23 del sexo masculino y 3 del sexo femenino, entre 15 y 55 años, con

(1) Parte de la tesis "Antígeno capsular, variedades y serotipos de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida y neurocriptococosis, São Paulo, Brasil", 1988, presentada para optar al título de Master en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Escola Paulista de Medicina, São Paulo, por B. CALVO.

(2) Disc. Biología Celular y Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

(3) Hospital Emílio Ribas, São Paulo, SP, Brasil.

(4) Hospital Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira". São Paulo, SP, Brasil.

SIDA y neurocriptococosis, tratados en los Hospitales Emilio Ribas, Sao Paulo y Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira", en la ciudad de Sao Paulo, Brasil.

La selección de los pacientes fue basada en la presencia de manifestaciones neurológicas y el estudio micológico de LCR, por microscopía directa con tinta China y cultivo en medios comunes.

Se estableció como requisito que los pacientes tuvieran el primer episodio de neurocriptococosis, y no hubieran comenzado el tratamiento de la micosis, o estuvieran en el inicio del mismo. Se consideró inicio del tratamiento hasta una dosis total de 2 mg/kg de Anfotericina B, y 1g/kg de 5 fluorocitosina¹. Se usaron dos (2) esquemas de tratamiento, según las normas de cada institución, consistiendo el esquema 1, en Anfotericina B sola, a la dosis de 0.6 mg/kg/d por vía endovenosa (EV) durante 6 semanas y el esquema 2, Anfotericina B, 0,3 mg/kg/d EV más 5-fluorocitosina 150 mg/kg/d por 1 mes, aproximadamente. A ningún paciente se administró Anfotericina B por vía intratecal.

Dos pacientes uno de cada esquema, rehusaron continuar tratamiento.

Método

A cada paciente se extrajo una muestra de LCR y otra de suero, ambas el mismo día, ó con 1 ó 2 días de intervalo entre ellas. Estas muestras fueron tomadas antes o al inicio del tratamiento, correspondiendo al primer examen; posteriormente, fueron tomadas muestras con una dosis total de 750 mg de Anfotericina B, aproximadamente, señalada como segundo examen; y un tercer examen fue realizado cuando la dosis total de Anfotericina B alcanzaba 1500 mg. En un paciente no se tomó muestra de suero en el primer examen.

Las muestras de LCR fueron tomadas por punción lumbar ó sub-occipital, según la rutina de cada hospital.

El estudio micológico de LCR fue realizado a partir del sedimento de este, por examen al fresco con tinta China, y cultivo en Sabouraud dextrosa o Sabouraud dextrosa más cloranfenicol al 0.05%, incubados a 25 y 37°C. Los cultivos fueron observados hasta 6 semanas, antes de ser considerados nega-

tivos. Para la identificación de *C. neoformans* se usaron las pruebas bioquímicas clásicas, además de producción de pigmento marrón sobre el medio de Staib²⁹ y esculina⁷.

La técnica empleada para detectar Ag PC fue AL, y el Kit, fue Crypto La del "International Biological Labs., Inc. Dist.", New Jersey, USA. El procedimiento utilizado siguió las instrucciones del Kit referido. Para la cuantificación se hicieron algunas modificaciones, debido a títulos muy altos de Ag PC en pacientes con SIDA y criptococosis; por esta razón, las muestras fueron diluidas en una placa de polietileno de 96 hoyuelos con fondo plano, usada en la técnica de ELISA, con diluciones al doble hasta 1:4096; continuando con diluciones mayores si era necesario.

Método estadístico

Para el análisis de los resultados fueron empleadas las siguientes pruebas:

1. Prueba de Q de Cochran¹⁷ con el objetivo de estudiar las discordancias entre los resultados observados por microscopía directa, cultivo y detección de Ag PC en LCR y suero.
2. Prueba de McNemar¹⁵ para estudiar las discordancias entre los títulos de Ag PC. Los valores de los títulos se agruparon en clases.
3. Prueba de la probabilidad exacta de Fisher¹⁶ cuando se estudiaron variables consideradas en el estudio.
4. Prueba de U Mann - Whitney¹⁶, para dos muestras independientes, cuando se compararon los resultados entre el grupo de fallecidos y de sobrevivientes.

En todas las pruebas se fijó en 0.05 ó 5% ($\alpha \leq 0.05$) el nivel para rechazo de la hipótesis nula, señalándose con un asterisco los valores significantes.

RESULTADOS

Neurocriptococosis representó la primera infección oportunista y fue indicador del síndrome, en 23 y 19.2% de los casos, respectivamente. La detección de Ag PC de *C. neoformans* en LCR y suero fue

positiva en el 100% de los casos examinados. Al aplicar la prueba de Q de Cochran a estos resultados junto con los del examen micológico (positivo en 96,3% en la microscopia directa, y 100% en el cultivo) no se encontró discordancia significativa entre ellos.

Los títulos del Ag PC del primer examen fueron singularmente altos. Estos títulos están presentados en clases en la Tabla 1, indicando que en la clase de 1:8192 a 1:262.144 se encontraron 14 (53,9%) y 13 (59%) pacientes, al considerar los títulos de LCR y suero respectivamente.

También en el primer examen al estudiar la relación entre títulos de Ag PC entre los dos líquidos

TABLA 1

Pacientes con SIDA y neurocriptococosis, distribuidos según las clases de títulos de antígeno capsular de *C. neoformans*, en el primer examen de LCR y suero.

TITULOS	TIPO DE MUESTRA			
	LCR		SUERO	
	Nº	%	Nº	%
1:128 - 1:4096	7	26,9	0	0,0
1:8192 - 1:262.144	14	53,9	13	52,0
1:524.288 - 1:16.777.216	5	19,2	10	40,0
> 1:16.777.216	0	0,0	2	8,0
TOTAL	26	100,0	25 ^A	100,0

Δ De los 26 pacientes, en 1 no se realizó detección de antígeno en el primer examen de suero.

corporales analizados, se observó que en la mayoría de los pacientes el título de Ag PC en LCR era menor que en suero, resultando una discordancia significativa al emplear la prueba de McNemar (Tabla 2).

La asociación entre mortalidad y títulos iniciales de Ag PC en LCR y suero, al usar la prueba de U de Mann-Whitney, mostró no ser significativa para títulos en LCR pero fue significativa con los títulos en suero, hallándose una media geométrica de 1:118.715 en quienes sobrevivieron y 1:1.246.951 en quienes fallecieron (Tabla 3).

La mortalidad entre los pacientes según su distribución en los dos esquemas de tratamiento fue, respectivamente, 75% y 58,3% para los esquemas 1 y 2, no siendo esa diferencia significativa por la prueba de Fisher (Tabla 4).

Todos los pacientes con títulos iniciales de antígeno en LCR > 1:262.144 murieron, de ellos 4 recibieron Anfotericina B, sola, y a 1 se le administró el esquema 2. Pacientes con títulos ≤ 1:262.144 presentaron evolución variable con ambos esquemas de tratamiento, fallecieron 5 de 8 a quienes se administró el esquema 1, y 6 de 11 quienes recibieron el esquema 2.

En suero, los 2 pacientes en quienes se encontraron al inicio títulos de antígeno > 1:16.777.216 fallecieron, a ambos se les suministró Anfotericina B más 5-fluorocitosina. De 10 pacientes quienes presentaron títulos entre 1:524.288 y 1:16.777.216, murieron 6 de 7 a quienes se les administró el esquema

TABLA 2

Pacientes con SIDA y neurocriptococosis, según relación entre los títulos de antígeno capsular de *C. neoformans* en LCR y en suero, en el primer examen.

LCR	SUERO				TOTAL
	1:128-1:4096	1:8192-1:262.144	1:524.288-1:16.777.216	>1:16.777.216	
1:128 - 1:4096	0	5	2	0	7
1:8192 - 1:262.144	0	8	4	1	13
1:524.288 - 1:16.777.216	0	0	4	1	5
> 1:16.777.216	0	0	0	0	0
TOTAL	0	13	10	2	25 ^A

Δ De los 26 pacientes, en 1 no se realizó detección de antígeno en el primer examen de suero.

Prueba de McNemar: $X^2 = 13.00/x^2 (1 \text{ g } 1,5\%) = 3,84$.

Concordancia diagonal = 48%.

Encima de la diagonal = 52%.

Debajo de la diagonal = 0%.

1, y 1 de 3 quienes recibieron el esquema 2. Los 11 pacientes restantes con títulos de antígeno en el primer examen $\leq 1:262.144$, mostraron una evolución semejante, ya que fallecieron 2 de 3, y 2 de 4 pacientes con los esquemas 1 y 2 respectivamente.

DISCUSION

Neurocriptococosis fue la primera infección oportunista en 23% de los pacientes, atendiendo la clasificación actual del Centro para Control de Enfermedades (CDC)³, siendo este porcentaje semejante a observaciones antes señaladas¹⁰ pero menor que

los de otras²³. Fue indicador del síndrome en 19,2% de los casos resultando inferior que el porcentaje reportado por otras investigaciones^{4,10}.

La forma clínica mas frecuente estuvo representado por Meningitis.

Con respecto al estudio micológico del primer examen de LCR, cabe resaltar que en uno de los casos se observaron al fresco formas multibrotantes de la levadura, pero no fueron vistas en el cultivo de la misma muestra, coincidiendo con datos ya referidos¹³; su patrón de asimilación de nitrógeno y carbohidratos, y comportamiento en medio de Staib, fue igual al de las otras cepas, aunque en el medio de esculina presentó una tonalidad más clara que las restantes. Estudios adicionales son necesarios para conocer sus características, bioquímicas e inmunológicas con otras pruebas, y en modelos experimentales.

Nuestros resultados en cuanto a la sensibilidad del examen al fresco, 96.3%, fueron superiores a los de otros autores^{4,10,23}; y en relación al cultivo, 100%, corroboraron observaciones ya reportadas^{10,23}.

La detección de Ag PC en LCR y suero (100% en ambos) mostró porcentajes mayores, generalmente, que los de CHUCK & SANDE¹¹, KOVACS et al.¹⁰, STAIB & SEIBOLD²¹ y ZUGER et al.²³, quienes también, sin embargo, señalaron que la detección de Ag PC en los dos fluidos mencionados, fue frecuentemente positiva. Llamó la atención el hallazgo de títulos singularmente altos, como fue mencionado en resultados. Esta observación podría estar relacionada con el efecto de supresión

TABLA 3

Pacientes* con SIDA y neurocriptococosis, según asociación de mortalidad y media geométrica de los títulos de antígeno capsular de *C. neoformans* en el primer examen de LCR y suero.

MEDIA GEOMETRICA DE TITULOS

	LCR	SUERO
Sobrevivientes	1:10264	1:118.715 ^Δ
Fallecidos	1:92.682	1:1246951

* Dos paciente rehusaron continuar tratamiento.
 Δ En un paciente no se realizó detección de antígeno capsular en el primer examen de suero.

Prueba de Mann-Whitney

LCR	SUERO
U calculado = 40,5	U calculado = 25*
U crítico = 31	U crítico = 26

TABLA 4

Pacientes con SIDA y neurocriptococosis, según asociación de mortalidad y esquemas de tratamiento, hasta 1500 mg de anfotericina B.

ESQUEMA DE TRATAMIENTO	EVOLUCION			%
	MUERTOS	SOBREVIVIENTES	MORTALIDAD	
1	9*	3	12	75,00
2	7*	5	12	58,33
TOTAL	16	8	24 ^Δ	66,67

Δ De los 26 pacientes, 2 solicitaron alta hospitalar y se desconoce su evolución.

* Dos pacientes, uno en cada esquema, rehusaron continuar tratamiento.

Prueba de Fischer

P = 0,3334 ó 33,34%

antígeno-específico de *C. neoformans*¹⁴ que junto con la alteración de la inmunidad celular en SIDA conllevarían a una más severa y progresiva criptococosis. En nuestra casuística fue encontrada la forma diseminada en 4 de 5 autopsias del grupo estudiado, y sus títulos de Ag PC en suero fueron $\geq 1:524.288$. Otro factor que puede influir en este exceso de antígeno, son las variaciones en relación al tamaño de la cápsula¹⁸, composición y tamaño molecular¹⁹, y capacidad antifagocítica entre cepas del serotipo A de *C. neoformans*, el cual prevaleció en nuestro estudio. Títulos de Ag PC hasta 1:2.000.000 en suero de pacientes con SIDA, han sido reportados excepcionalmente⁸.

Además se encontraron títulos de Ag PC más altos en suero que en LCR, lo cual podría deberse a mayor tiempo de permanencia de *C. neoformans* fuera del SNC, permitiendo una mayor extensión de la infección a otros órganos. Entre los 4 casos de este estudio que presentaban criptococosis diseminada en autopsia, se observó en todos Meningoencefalitis y se demostró hasta 9 órganos afectados (cerebro, pulmón, hígado, bazo, ganglios, riñón, suprarrenales, páncreas, médula ósea) en un mismo paciente, lo cual corroboraría los títulos de Ag PC encontrados en suero de ellos. Desde el punto de vista clínico tanto en estos pacientes como en los demás, fiebre y cefalea fueron los síntomas más frecuentes.

En cuanto a los niveles de Ag PC en LCR y suero, se observó asociación entre títulos en suero y mortalidad, pero no hubo relación con títulos en LCR, lo cual difiere de ZUGER et al.²³. Nuestros resultados parecen sugerir que hay mayor mortalidad, a pesar de tratamiento adecuado, cuando se presenta la forma diseminada, si consideramos elevados títulos de Ag PC en suero como expresión de esa forma clínica.

En los 16 pacientes que sobrevivieron para el segundo examen, y 6 para el tercero, se hicieron estudios micológico y serológicos, sugiriendo los resultados un comportamiento diferente para el cultivo, ya que este tendía a ser negativo, mientras que el examen al fresco (microscopía directa) y la detección de Ag PC en LCR y suero se mantuvieron positivos, aún después de tratamiento y de mejoría del cuadro clínico. La persistencia del examen directo positivo ya ha sido mencionada^{4,21}.

Los títulos en LCR tendieron a disminuir, pero en suero permanecieron inalterados. Este hallazgo ha sido encontrado en otro estudio de criptococosis y

SIDA⁸. En pacientes con estas dos afecciones se ha sugerido que aún estando la levadura muerta, continúa la eliminación del antígeno, o presentan incapacidad a retirarlo de la circulación⁸; además se ha señalado la próstata como posible reservorio de *C. neoformans* en esos pacientes a pesar de tratamiento eficaz¹¹. Experimentalmente se ha observado hígado y bazo de ratones no inmunes, como los tejidos con mayor capacidad de almacenar dicho antígeno¹²; refiriendo también otros autores, que el tiempo del curso del antígeno capsular en circulación, aumenta paralelamente al hallazgo de criptococo en el bazo, y de las cápsulas deterioradas in situ⁹.

La mortalidad en nuestra casuística fue de 66,6%, aunque no pudo atribuirse a criptococosis únicamente por no disponer de los resultados de las autopsias de todos los pacientes; no encontrándose diferencia significativa en su relación con las dos esquemas de tratamiento, lo cual confirma otras observaciones^{4, 10}. El porcentaje de mortalidad antes indicado es mayor a otros reportados^{10, 23}, tal vez influyendo diferencia en el estado nutricional de los pacientes, y metodología para diagnóstico y tratamiento de la infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana e infecciones oportunistas asociadas a SIDA.

SUMMARY

Detection of capsular polysaccharide antigen of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS and neurocryptococcosis.

Capsular polysaccharide antigen (AgPC) of *Cryptococcus neoformans* was detected by latex agglutination technique (LA) in cerebrospinal fluid and serum of patients with AIDS during their first central nervous system manifestation of the disease. Direct mycological examination and culture were used as controls. Sensitivity was 100% by LA allowing an early specific treatment of cryptococcosis. Initial titres of AgPC in such patients can be > 1000000 and it appears that when such titres are present in the serum they are related to mortality during treatment. Surviving patients showed positivity of the direct mycological examination and AgPC of *C. neoformans* in cerebrospinal fluid and sera even after treatment and clinical recovery.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BENNETT, J.E.; DISMUKES, W.E.; DUMA, R.J.;

- MEDOFF, G.; SANDE, M.A.; GALLIS, H.; LEONARD, J.; FIELDS, B.T.; BRADSHAW, M.; HAYWOOD, H.; MCGEE, Z.A.; CATE, T.R.; COBS, C.G.; WARNER, J.F. & ALLING, D.W. - A comparison of anfotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *New Engl. J. Med.*, 301: 126-131, 1979.
2. BIANCALANA, M.L.N.; STEFANI, H.N.V.; PASTERNAK, J.; ROSENTHAL, C.; LEVI, G.C. & MENDONÇA, J.S. - AIDS in São Paulo-Brasil: clinical experience with 116 hospitalized cases. In: INTERNATIONAL CONGRESS FOR INFECTIOUS DISEASES/ CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA, 5, Rio de Janeiro, 1988. **Abstract**. Rio de Janeiro, International Society for Infectious Diseases, 1988. p. 255. (Abstract 672).
 3. CLASSIFICATION System for Human T-lymphothopic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infections. *Ann. intern. Med.*, 102: 234-237, 1986.
 4. CHUCK, S.L. & SANDE, M.A. - Infections with *Cryptococcus neoformans* in the adquired immunodeficiency syndrome. *New Engl. J. Med.*, 321: 794-799, 1989.
 5. DELMONTE, V.L.C. & SALDIVA, P.H.N. - Autopsy findings in 45 AIDS patients in Brasil. In INTERNATIONAL CONGRESS FOR INFECTIOUS DISEASES/ CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA, 5, Rio de Janeiro, 1988. **Abstract**. Rio de Janeiro, International Society for Infectious Diseases, 1988. p. 75. (Abstract 267).
 6. DIAZ, R.; SADER, H.; STAVALE, J.; CAMARGO, L.F.; COLOMBO, A. & ACCETTURI, C. - Aspectos clínicos epidemiológicos e anatomopatológicos da criptococose na SIDA (AIDS) *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 22 (Supl.): 159, 1989. (Abstract 116).
 7. EDBERG, S.; CHASKES, S.J.; ALTURE-WERBER, E. & SINGER, J.M. - Esculin-based medium for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. *J. clin. Microbiol.*, 12: 332-325, 1980.
 8. ENG, H.K.; BISHBURG, E.; SMITH, S.M. & KAPILA, R. - Cryptococcal infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Med.*, 81: 19-23, 1986.
 9. ENG, R.H.K. & HARRIS, R. - Mobilization of cryptococci and antigens during infection: a mouse model. *Rev. ibér. Micol.*, 5 (Supl. 1): 103, 1988. (Abstract p. 211).
 10. KOVACS, J.A.; KOVACS, A.A.; POLIS, M.; WRIGHT, W.C.; GILL, V.J.; TUAZON, C.U.; GELMAIN, E.P.; CLIFFORD, L.; LONGFIELD, R.; OVERTURF, G.; MACHER, A.M.; FAUCI, A.S.; PARRILLO, J.E.; BENNETT, J.E. & MASUR, H. - Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. intern. Med.*, 103: 533-538, 1985.
 11. LARSEN, R.A.; BOZETTE, S.; McCUTCHAN, A.; CHIU, J.; LEAL, M.A. & RICHMAN, D. - Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful treatment of meningitis. *Ann. intern. Med.*, 111: 125-128, 1989.
 12. MUCHMORE, H.G.; SCOTT, E.N.; FELTON, F.G. & FROMTLING, R.A. - Cryptococcal capsular polysaccharide: clearance in nonimmune mice. *Mycopathologia (Den Haag)*, 78: 41-45, 1982.
 13. MUCHMORE, H.G.; SHADOMY, H.J.; SCOTT, E.N.; SLATER, L.N. & DAVIS, B.A. - Multiple budding in yeast cells of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. ibér. Micol.*, 5 (Supl. 1): 102, 1988. (Abstract p. 207).
 14. MURPHY, J.W. - Celular responses against *Cryptococcus neoformans* antigens. In: TORRES-RODRIGUEZ, J.M., ed., Proceedings of the X Congress of the International Society for Human and Animal Micology - ISHAM. Barcelona, Spain, Prous Science, 1988. p. 36-40.
 15. SIEGEL, S. - El caso de dos muestras relacionadas. In: SIEGEL, S. - *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. 2. ed. Mexico, Trillas, 1972. p. 84-118.
 16. SIEGEL, S. El caso de dos muestras independientes. In: SIEGEL, S. - *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. 2 ed. Mexico, Trillas, 1972. p. 120-186.
 17. SIEGEL, S. - El caso de K muestras relacionadas. In: SIEGEL, S. - *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. 2 ed. Mexico, Trillas, 1972. p. 188-202.
 18. SMALL, J. & MITCHELL, T. - Binding of purified and radioiodinated capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* Serotype A strains to capsulefree mutants. *Infect. Immun.*, 54: 742-750, 1986.
 19. SMALL, J.M. & MITCHELL, T.G. - Strain variation in antiphagocytic activity of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Infect. Immun.*, 57: 3751-3756, 1989.
 20. SMALL, J.M.; MITCHELL, T.G. & WHEAT, R.W. - Strain variation in composition and molecular size of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Infect. Immun.*, 54: 732-741, 1986.
 21. STAIB, F. & SEIBOLD, M. - Mycological-diagnostic assessment of the efficacy of amphotericin-B+flucytosine to control *Cryptococcus neoformans* in AIDS patients. *Mycoses*, 31: 175-186, 1988.
 22. STAIB, F.; SEIBOLD, M.; ANTWEILER, E.; FROHLICH, B.; WEBER, S. & BLISSE, A. - The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis. control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zbl. Bakt. Hyg. A.*, 266: 167-177, 1987.
 23. ZUGER, A.; LOUIE, E.; HOLZMAN, R.S.; SIMBERKOFF, M.S. & RAHAL, J.J. - Cryptococcal disease in patient with the acquired immunodeficiency syndrome. Diagnostic features and outcome of treatment. *Ann. intern. Med.*, 104: 234-240, 1986.