روش جدید رنگ آمیزی جهت تشخیص سریع کریپتوکوکوزیس

صادق خداویسی[1]، نوشین عبدالملکی[2]، سهیلا محمودپور[3]، اعظم فتاحی[1]
[1] دانشجوی دکتری تخصصی قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[2]کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان
[3] دکتری علوم آزمایشگاهی، آزمایشگاه پاستور، سنندج

خلاصه:

کریپتوکوکوزیس بیماری قارچی کشنده‌ای است که معمولاً به صورت فرصت طلب در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف مشاهده می‌شود و کریپتوکوکوس نئوفورمنس پاتوژن اصلی آن می‌باشد. در آزمایشگاه معمولاً از روش رنگ آمیزی منفی با استفاده از جوهر هندی و نیز رنگ آمیزی آلیسین بلو (به طور انتخابی برای شناسائی کریپتوکوکوس نئوفورمنس) استفاده می‌شود، ولی از آنجا که تشخیص سریع عوامل بیماری برای درمان ضروری است برای مقابله با چنین محدودیتی روش جدید رنگ آمیزی شناسائی و ابداع شده است که به سرعت می‌تواند کریپتوکوکوس را شناسائی نماید. این روش منحصر به فرد قادر است کریپتوکوکوس را به گونه‌ای رنگ آمیزی کند که به صورت مستقیم و با استفاده از میکروسکوپ نوری قابل شناسائی و شمارش باشد. در مقایسه روش جدید با روش‌های قدیمی نظیر جوهر هندی و آلیسین بلو، این روش دارای برتری و مزیت خاصی برای شناسائی سریع کریپتوکوکوس می‌باشد. این روش پایدار، قاطع و اختصاصی بوده و با توجه به کم هزینه بودن در اکثر نقاط دنیا قابل استفاده می‌باشد.

مقدمه:

کریپتوکوکوزیس، بیماری قارچی کشنده در افراد با ضعف سیستم ایمنی می‌باشد (۲،۱). کریپتوکوکوس نئوفورمنس و به میزان کمتری کریپتوکوکوس گاتی مهم‌ترین پاتوژن‌های این جنس قارچی هستند که با ایجاد عفونت‌های ریوی و مننژیت تهدیدی برای حیات انسان می‌باشند (۳). سایر گونه‌های کریپتوکوکوس از جمله آلبیدوس، کورواتوس، هومیکولوس، یونیگوتولاتوس و لارنتی نیز در ایجاد عفونت‌های فرصت طلب نقش دارند.

درمان سریع عفونت‌های فرصت طلب نیازمند تشخیص آزمایشگاهی سریع می‌باشد (۹ـ۴)، بنابراین در سال‌های اخیر نیاز به تست‌های سریع و با دقت جهت شناسایی کریپتوکوکوس در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ضروری به نظر می‌رسد. از روش‌های رایج تشخیص کریپتوکوکوزیس، اسمیر مستقیم، هیستوپاتولوژی، کشت و سرولوژی می‌باشد (۱۲ـ۱،۲،۱۰). درمان بیماری سریعاً بعد از تشخیص میکروسکوپی مایع مغزی نخاعی و جداسازی ارگانیسم از کشت خون آغاز می‌شود

(۱۶ـ۱۳). برای تهیه اسمیر مستقیم معمولاً از جوهر هندی استفاده می‌شود و این در حالیست که جوهر هندی تنها ۶۰ درصد موارد مثبت که کشت آنها نیز مثبت می‌باشد را نشان می‌دهد (۱۷).

آزمایش میکروسکوپی

سلول‌های کریپتوکوکوس کروی تا بیضی شکل به قطر ۵ تا ۱۰ میلی‌متر بوده که بوسیله کپسول پلی‌ساکاریدی احاطه شده‌اند (۱۸). کپسول حاوی ترکیباتی است که بعنوان آنتی‌ژن کریپتوکوکوس و فاکتور بیماریزایی عمل می‌کند (۱۳). البته گاهی در مواردی از بیماری پیش می‌آید که این آنتی‌ژن به صورت ناکارآمد عمل کرده و نتایج منفی کاذب حاصل می‌شود (۲). سلول‌های کروی و بزرگ شبه مخمری کریپتوکوکوس را می‌توان بوسیله سل‌کانتر شمارش کرد. البته در نمونه‌هایی مانند CSF تشخیص کریپتوکوکوس از ذرات WBC و آلودگی‌ها کمی مشکل خواهد بود. رنگ آمیزی آلیسین‌بلو همچنین برای تشخیص کریپتوکوکوزیس در بیماران ایدزی که به فرم منتشره کریپتوکوکوزیس مبتلا هستند، استفاده می‌شود (۱۹).

اخیراً از روش رنگ آمیزی مستقیم و ساده‌ای با استفاده از اوانس‌بلو برای شناسایی کریپتوکوکوس استفاده می‌شود که روش رنگ آمیزی ون (Wan) نام دارد در این روش کریپتوکوکوس به آسانی رنگ شده و زیر میکروسکوپ قابل مشاهده می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

محلول‌های رنگ آمیزی

۱- محلول رنگ آمیزی ون از حل کردن یک گرم اوانس‌بلو در محلولی حاوی یک سی‌سی اسید استیک غلیظ و ۹۹ سی‌سی آب مقطر به دست می‌آید.

۲-محلول رنگ آمیزی آلیسین‌بلو از حل کردن یک گرم آلیسین‌بلو در یک سی‌سی اسید استیک و ۹۹ سی‌سی آب مقطر به دست می‌آید.

استرین‌های قارچی و محیط‌ها

کریپتوکوکوس آلبیدوس، کریپتوکوکوس لارنتی، کاندیدا لوزیتانیا و کاندیدا روگوزا بعنوان نمونه کنترل کیفی خارجی و کریپتوکوکوس نئوفورمنس (ATCC32609) و کریپتوکوکوس لارنتی (ATCC18803) به منظور کنترل کیفی استفاده شد. تمام ایزوله‌ها در محیط سابورو آگار نگهداری شدند و قبل از هر آزمایش، به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

نمونه‌های مورد آزمایش:

نمونه A: سوسپانسیون یکنواختی از سلول‌های WBC انسانی همراه با قارچ‌های کریپتوکوکوس و کاندیدا در ۲ سی‌سی سرم فیزیولوژی تهیه می‌شود.

نمونه B: کریپتوکوکوس را به محلول فوق اضافه می‌کنیم.

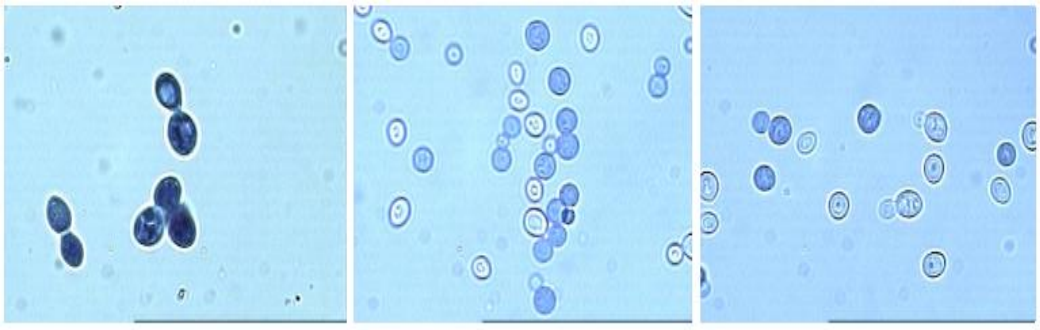
۵۰ لاندا از هر کدام از محلول‌های فوق را با ۵۰ لاندا از رنگ ون مخلوط کرده و با عدسی ۴۰ و ۱۰۰ زیر میکروسکوپ بررسی می‌کنیم.

نمونه‌های بالینی: مجموعاً ۷۳ نمونه CSF گرفته شده از بیماران آنسفالیت مغزی و ۱۱ نمونه مایع لاواژ از بیماران مبتلا به عفونت‌های دستگاه تنفسی تحتانی و ۳ نمونه کشت خون در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

در نمونه‌های بالینی برای شناسایی کریپتوکوکوس از رنگ‌های جوهر هندی و رنگ آمیزی ون استفاده شد. در صورت جدا شدن کریپتوکوکوس، سلول‌های قارچی با کمک سل‌کانترهای دستی شمارش می‌شدند. رقت‌های (۲۰-۱۰، ۲۰۰-۱۰۰ و ۲۰۰۰-۱۰۰۰ سلول بر میکرولیتر) از کریپتوکوکوس جدا شده از CSF تهیه شد. هر نمونه سه بار با رنگ آمیزی‌های آلیسین بلو، جوهر هندی و رنگ آمیزی ون آزمایش و هر بار هم توسط سل‌کانتر شمارش شدند.

نتایج:

گونه‌های بالینی شایع کریپتوکوکوس و همچنین ترکیبی از گونه‌های رایج کریپتوکوکوس و کاندیدا همزمان به روش ون رنگ آمیزی شدند. C. آلبیدوس و C. لارنتی جدا شده از نمونه‌های بالینی و همچنین C. نئوفورمنس و C. لارنتی که جهت کنترل کیفیت استفاده شده بودند به رنگ آبی یا آبی تیره درآمدند، در حالیکه گلبول‌های سفید خون و کاندیداهای گلابراتا و تروپیکالیس رنگ نگرفتند. همچنین لازم به ذکر است که کاندیدا روگوزا نیز کمتر از یک درصد رنگ پذیری داشته است، بنابراین سلول‌های کریپتوکوکوس رنگ آمیزی شده کاملاً از نمونه‌های شایع کاندیدا قابل تشخیص هستند. این نشان دهنده دقت و توانائی روش ون درتشخیص کریپتوکوکوس می‌باشد.



A B C

تصویر ۱. نتایج رنگ آمیزی قارچ‌های شایع با روش ون

A) کریپتوکوکوس آلبیدوس در رنگ آمیزی ون آبی رنگ مشاهده می‌گردد.

B) کریپتوکوکوس نئوفورمنس (ATCC 32609) به رنگ آبی در آمده در حالیکه سلول‌های کاندیدا گلابراتا رنگ نگرفتند.

C) کرپتوکوکوس لارنتی (ATCC 18803) به رنگ آبی درآمده اما کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا گلابراتا رنگ نگرفتند.

ثبات رنگ آمیزی در روش رنگ آمیزی ون

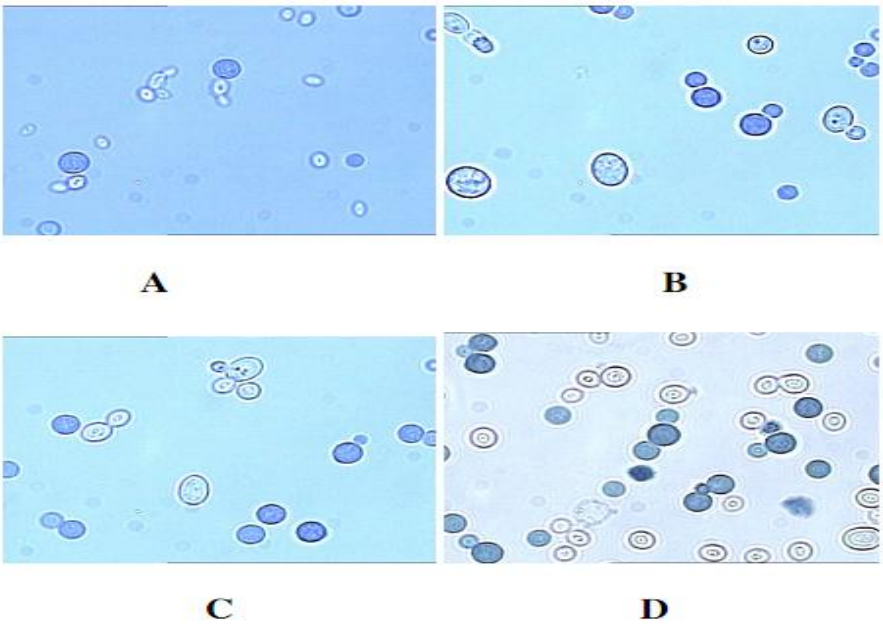
استمرار و دوام رنگ آمیزی ون برای ترکیبی از کریپتوکوکوس و کاندیدا در فواصل زمانی متفاوت مورد مقایسه قرار گرفت (۱، ۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه). کریپتوکوکوس در مدت زمان ۱ دقیقه رنگ گرفت در حالیکه کاندیدا در این فاصله زمانی رنگ نگرفت. روش رنگ آمیزی ون یک روش پایدار و اختصاصی برای رنگ آمیزی سلول‌های کریپتوکوکوس می‌باشد. در رنگ آمیزی همزمان، کریپتوکوکوس کاملاً قابل تشخیص از کاندیدا بوده و در دمای اتاق تا یکسال قابل نگهداری است. احتمال استفاده بالینی روش آزمایشگاهی ون برای شناسائی سریع کریپتوکوکوس در نمونه آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است و نمونه بالینی را با روش جدید معرفی شده و نیز روش رایج جوهر هندی مورد بررسی و مقایسه قرار دادند.

برای شناسائی کریپتوکوکوس نمونه‌های CSF، مایع لاواژ و کشت خون با دو روش ون و جوهر هندی رنگ آمیزی شدند؛ سلول‌های کریپتوکوکوس در ۳/۷۳ نمونه‌های CSF و ۳/۳ نمونه‌های خون تشخیص داده شدند. درحالیکه در هیچکدام از ۱۱ نمونه مایع لاواژ کریپتوکوکوس مشاهده نشد. آلیسین بلو همانند روش رنگ آمیزی ون قادر به رنگ آمیزی کریپتوکوکوس می‌باشد. در هنگام استفاده از رنگ آلیسین بلو مهارت تکنسین جهت جلوگیری از چسبندگی کریپتوکوکوس‌ها مهم است.

حجم بالای رنگ زمینه در رنگ آمیزی جوهر هندی نسبت به نمونه می‌تواند منجر به پاسخ منفی کاذب در این روش شود. در حالیکه در روش رنگ آمیزی ون سلول‌های کریپتوکوکوس به رنگ آبی همراه با کپسول‌های درخشان در زمینه شفاف و فاقد تجمع سلولی قابل مشاهده می‌باشند.

در بررسی نتایج رنگ آمیزی‌های انجام شده، پاسخ منفی کاذب مشاهده شد که تعداد نتایج منفی کاذب با روش ون درمقایسه با روش جوهر هندی بسیار کمتر می‌باشد. از 10 نمونه تست انجام شده در مقایسه با جوهر هندی، درصد بسیار کمی از نتایج منفی کاذب بدست آمده مربوط به روش ون می‌باشد. (۳٪)، که این امر صرفاً در رقت‌های پایین سلول‌های کریپتوکوکوس (۱۰ تا ۲۰ سلول در میکرولیتر) رخ داده است.

نتایج منفی کاذب به دست آمده در روش رنگ آمیزی جوهر هندی، درصد بالاتری از روش ون داشته (۱۰٪) که 8٪ آن در رقت پایین سلول‌های کریپتوکوکوس (۱۰ تا ۲۰ سلول در میکرولیتر) و 2٪ در رقت متوسط (۱۰۰ تا ۲۰۰ سلول در میکرولیتر) می‌باشد.



تصویر ۲- پایداری رنگ آمیزی ون.

پایداری رنگ آمیزی به روش ون در ترکیبی از کریپتوکوکوس و کاندیدا در زمان‌های متفاوت با یکدیگر مقایسه گردید.

A) ۱ دقیقه، B) ۵ دقیقه، C) ۳۰ دقیقه و D) ۶۰ دقیقه.

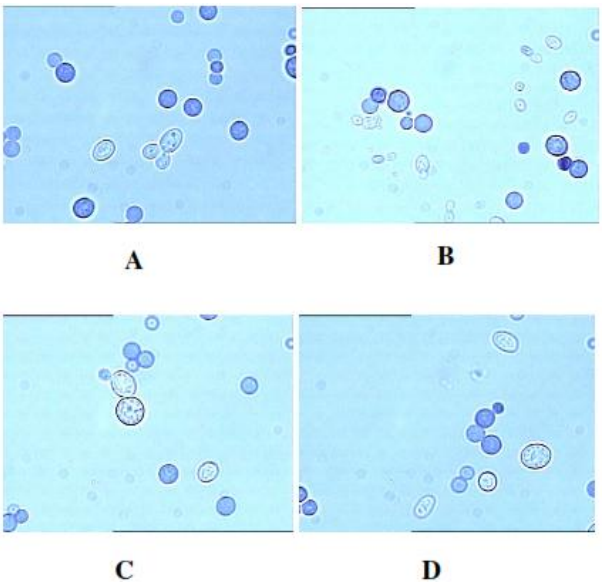
سلول‌های کریپتوکوکوس با رنگ آمیزی ون بعد از یک دقیقه قابل مشاهده بودند، در حالیکه سلول‌های کاندیدا حتی بعد از ۶۰ دقیقه رنگ نگرفتند.

شمارش سلول‌های کریپتوکوکوس رنگ آمیزی شده با روش ون

چنانچه ذکر شد سلول‌های کریپتوکوکوس رنگ آمیزی شده به روش ون کاملاً قابل تشخیص از WBC و کاندیدا می‌باشند. در روش رنگ آمیزی ون رنگ زمینه کاملاً روشن است که این امر موجب شمارش آسان و واضح سلول‌های کریپتوکوکال در سل‌کانتر می‌شود (تصویر ۵).

در مقابل، در رنگ آمیزی آلیسین بلو شمارش سلول‌ها بدلیل تجمع رنگ مشکل‌تر بوده و دقت شمارش کمتر می‌باشد، بنابراین دقت شمارش در روش ون بهتر از روش رنگ آمیزی آلیسین بلو می‌باشد که صحت آن بوسیله سه رقت (۲×۱۰ cells/µl، ۲×۱۰^{۲}، ۲×۱۰^{۳}) بررسی شد.

میانگین شمارش سلولی در رنگ آمیزی آلیسین بلو اندک است (نتایج منفی کاذب بیشتر مربوط به این روش می‌باشد که قبلاً توضیح داده شده است).

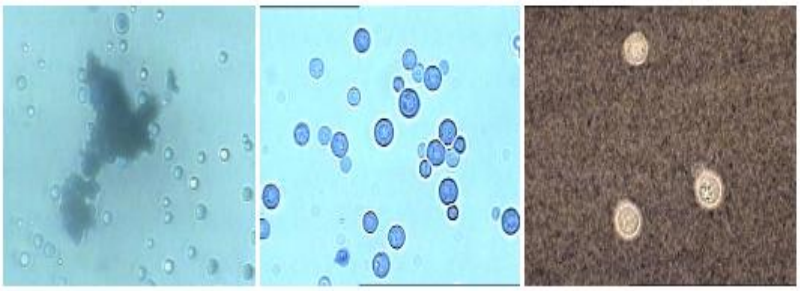


تصویر شماره ۳. پایداری روش رنگ آمیزی ون با عدسی ۴۰

ترکیبی از کریپتوکوکوس و کاندیدا به طور همزمان با روش ون، در دمای اتاق و فواصل زمانی مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند:

به ترتیب، A) یک سال، B) ۶ ماه، C) ۱ ماه، و D) در فاصله زمانی کمتر از یک روز (در همان روز آزمایش)

روش رنگ آمیزی ون دارای ثبات بالائی بوده که مشاهده شد سلول‌های کریپتوکوکوس برخلاف سلول‌های کاندیدا تا یکسال رنگ را حفظ می‌کنند (A).



تصویر شماره۴. مقایسه روش رنگ آمیزی کریپتوکوکوس با سه روش مختلف

A) روش آلیسین بلو: تجمع سلول‌های کریپتوکوکوس که اغلب اتفاق می‌افتد.

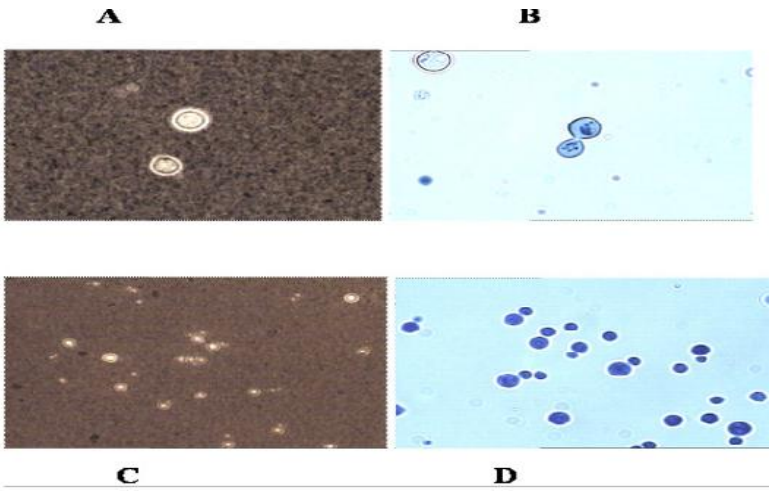
B) روش ون: سلول‌های کریپتوکوکوس در رنگ آمیزی ون به صورت آبی با کپسول‌های شفاف در زمینه‌ای واضح بدون تجمع سلولی مشاهده می‌شوند.

C) روش جوهر هندی: رنگ زمینه قسمت اعظم رنگ‌آمیزی را به خود اختصاص داده است.

تصویر شماره۵. رنگ آمیزی سلول‌های کریپتوکوکوس به روش ون و شمارش آنها
سلول‌های کریپتوکوکوس به رنگ آبی درآمده و به راحتی از سلول‌های سفید کاندیدا و سلول‌های WBC (با اندازه‌های نسبتاً بزرگتر) قابل تشخیص می‌باشند.

مقایسه وضوح سلول‌های کریپتوکوکوس در دو روش رنگ آمیزی ون و جوهر هندی با بزرگنمائی بالا (عدسی ۱۰۰) نشان دهنده وضوح بیشتر رنگ آمیزی ون نسبت به جوهر هندی می‌باشد. حتی در مواقعی که تصویر خیلی بزرگ شده است (مقایسه تصویر شماره A6 و B6). ساختارهای داخل سلولی کریپتوکوکوس در رنگ آمیزی ون کاملاً واضح بوده و کپسول شفاف در زمینه‌ای واضح مشاهده می‌شود (تصویر B6).

رنگ آمیزی جوهر هندی حالت روکش مانندی بر روی سلول‌های کریپتوکوکوس (مخصوصاً در سلول‌های کوچکتر) ایجاد می‌کند که منجر به پاسخ منفی کاذب می‌شود. این در حالی است که اندازه سلول در رنگ آمیزی ون، تأثیری در رنگ پذیری سلول نداشته و به وضوح قابل مشاهده می‌باشد (مقایسه تصویر شماره C6 و D6).



تصویر شماره ۶: مقایسه روش رنگ آمیزی ون و رنگ آمیزی هندی بر روی سلول‌های کریپتوکوکوس
A) سلول‌های کریپتوکوکوس با کپسول‌های شفاف در رنگ آمیزی جوهر هندی (عدسی۱۰۰)
B) ساختارهای داخل سلولی کریپتوکوکوس رنگ آمیزی شده به روش ون که همراه با کپسول شفاف بوضوح قابل مشاهده می‌باشند.
C) سلول‌های کریپتوکوکوس رنگ آمیزی شده با جوهر هندی با کپسول‌های شفاف و چندین سلول قارچی پوشیده از جوهر هندی می‌باشند (عدسی ۴۰).
D) سلول‌های کریپتوکوکوس رنگ آمیزی شده با روش ون در زمنیه شفاف. هیچگونه سلول قارچی با این روش پوشیده نشده است.

نتیجه گیری:

رنگ آمیزی ون روشی جدید است که آزمایشگاه بوسیله آن قادر به شمارش مستقیم سلول‌های کریپتوکوکوس با میکروسکوپ نوری بوده و جایگزینی برای روش جوهر هندی می‌باشد. در این روش غشاء سلولی کریپتوکوکوس به رنگ آبی تیره و سلول به رنگ آبی روشن در زیر میکروسکوپ دیده می‌شود. این روش اختصاصیت بالایی برای کریپتوکوکوس داشته به طوریکه قارچ‌های شبه مخمری و WBC با آن رنگ نمی‌گیرند و فقط پروتئین‌های کوچک کاندیدا روگوزا رنگ می‌شوند. با افزایش PH رنگ، می‌توان از این تداخل جلوگیری نمود. روش رنگ آمیزی ون دارای ثبات بالائی می‌باشد و سلول‌های رنگ آمیزی شده به روش ون به خوبی رنگ خود را بعد از یک سال حفظ می‌نمایند. بر اساس شواهد بدست آمده، این روش جایگزین بسیار خوبی برای رنگ آمیزی جوهر هندی و آلیسین بلو در شناسائی کریپتوکوکوس می‌باشد.

روش رنگ آمیزی ون، میزان تشخیص موارد مثبت را افزایش داده، مخصوصاً در مواقعی که پرسنل آزمایشگاهی تجربه کافی را ندارند این روش بسیار کمک کننده است. این روش بسیار سریع بوده و در مدت زمان اندکی رنگ آمیزی و شمارش انجام می‌شود. این مزیت، می‌تواند سرعت تشخیص بالینی عفونت‌های کریپتوکوکوسی را افزایش دهد. همچنین به جهت بالا بودن وضوح این روش در مشاهده ساختارهای داخلی سلول، بر خلاف روش رنگ آمیزی جوهر هندی، این روش را می‌توان در مطالعه مورفولوژی کریپتوکوکوس مورد استفاده قرار داد.

دیواره سلولی کریپتوکوکوس حاوی رنگدانه ملانین (دانه‌های سیاه) می‌باشد، که ممکن است منافذ دیواره را تحت تأثیر قرار دهد. وجود منافذ زیاد موجب نفوذ مولکول‌های کوچک رنگ ون به داخل سلول‌های کریپتوکوکوس می‌شود، هر چند که مطالعات بیشتری برای تشخیص مکانیسم دقیق آن مورد نیاز می‌باشد.

بنابراین این روش رنگ آمیزی جدید آزمایشگاه‌ها را قادر خواهد ساخت که با سرعت و اختصاصیت بالا، مستقیماً سلول‌های کریپتوکوکوس را همراه با سلول‌های خونی شمارش کنند. شناسائی کریپتوکوکوس به روش ون می‌تواند از نظر کمی و کیفی تکمیل گردد، با تأکید بر اینکه بکارگیری این روش می‌تواند باعث سرعت شناسائی و تشخیص عفونت‌های کریپتوکوکوس در نمونه‌های بالینی گردد. همچنین این روش سریع رنگ آمیزی تنها به دستگاه‌های بسیار ساده‌ای از قبیل

میکروسکوپ‌های نوری نیاز دارد، بنابراین روش رنگ آمیزی ون، برای استفاده بالینی مناسب بوده و در اکثر نقاط حتی در آزمایشگاه‌های کوچک کشورهای در حال توسعه نیز استفاده از آن امکان پذیر می‌باشد.

منابع:

1) perfect JR, Casadevall A (2002). Cryptococcosis. Infect. Dis. Clin.North. Am., 16: 837-874.
2) Gazzoni AF, Severo CB, Barra MB, Severo LC (2009). Atypicalmicromorphology and uncommon location of cryptococcosis: a histopathologic study using special histochemical techniques (one case report). Mycopathology, 167: 197-202.
3) Harding SA, Scheld WM, Feldman PS, Sande MA (1979). Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. Virchows.Arch. A. Pathol. Anat. Histol., 382: 113-118.
4) Kamalam A, Yesudian P, Thambiah AS (1977). Cutaneous infection by *Cryptococcus laurentii*. Br. J. Dermatol., 97: 221-223.
5) Velez A, Fernandez-Roldan JC, Linares M, Casal M (1996). Melanonychia due to *Candida humicola*. Br. J. Dermatol., 134: 375-376
6) Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA (1998). Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformanscryptococcaemia. Mycoses, 41: 277-280.
7) Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G,Papalambrou C,Legakis NJ (1998). First report of Cryptococcus laurentii meningitis and a fatal case of Cryptococcus albidus cryptococcaemia in AIDS patients. Med. Mycol., 36: 335-339.
8) Ritterband DC, Seedor JA, Shah MK, Waheed S, Schorr I (1998). Aunique case of *Cryptococcus laurentii* keratitis spread by a rigid gas permeable contact lens in a patient with onychomycosis. Cornea, 17: 115-118.
9) McCurdy LH, Morrow JD (2001). Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. South. Med. J., 94: 65-66.
10) Gal AA, Koss MN, Hawkins J, Evans S, Einstein H (1986). The pathology of pulmonary cryptococcal infections in the acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Pathol. Lab. Med., 110: 502-507.
11) Chayakulkeeree M, Perfect JR (2006). Cryptococcosis. Infect. Dis. Clin. North Am., 20: 507.
12) Gazzoni AF, Pegas KL, Severo LC (2008). Histopathological techniques for diagnosing cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus*: case report. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 41: 76-78.

13) Bloomfield N, Gordon MA, Elmendorf DF (1963). Detection of *Cryptococcus neoformans* Antigen in Body Fluids by Latex Particle Agglutination. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 114: 64-67.
14) Berlin L, Pincus JH (1989). Cryptococcal meningitis: false-negative antigen test results and cultures in nonimmunosuppressed patients. Arch. Neurol., 46: 1312-1316.
15) Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, Vainstein MH (2008). Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. Mycopathologia, 166: 71-75.
16) Bovers M, Hagen F, Boekhout T (2008). Diversity of the *Cryptococcus Neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. Rev. Iberoam. Micol., 25: S4-12.
17) Butler WT, Alling DW, Spickard A, Utz JP (1964). Diagnostic and Prognostic Value of Clinical and Laboratory Findings in Cryptococcal Meningitis, a Follow-up Study of Forty Patients. N. Engl. J. Med., 270:59-67.
18) Baker RD, Haugen RK (1955). Tissue changes and tissue diagnosis in cryptococcosis; a study of 26 cases. Am. J. Clin. Pathol., 25: 14-24.
19) Monteil RA, Hofman P, Michiels JF, Loubiere R (1997). Oral cryptococcosis: Case report of salivary gland involvement in an AIDS patient. J. Oral. Pathol. Med., 26: 53-56.