

**Caracterización de *Cryptococcus* spp.  
recuperados de pacientes y de detritos vegetales  
en La Habana, Cuba.  
IPK, 2013-14**

Trabajo en opción al Grado de  
Máster en Bacteriología-Micología

**Autora: Dra. Yizy Rivera Gallego**

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"  
Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología  
Departamento de Bacteriología-Micología

**Caracterización de *Cryptococcus* spp.  
recuperados de pacientes y de detritos vegetales  
en La Habana, Cuba.  
IPK, 2013-14**

Trabajo en opción al Grado de  
Máster en Bacteriología-Micología

Autora: Dra. Yizy Rivera Gallego

Tutora: Dra. Ma. Teresa Illnait Zaragozí; Dr. C.

Asesores: Lic. Carlos Fernández Andreu; Dr. C.  
Lic. Ernesto X. Monroy Vaca; M. Sc.

La Habana  
2015

*al laboratorio de Micología del IPK, una gran familia*

## AGRADECIMIENTOS

*Gracias a mi hija, sobre todas las cosas, por incentivar en mí cada día la necesidad de ser mejor.*

*En especial a mi familia por su apoyo y su estímulo constantes.*

*A mi pro-fe Tere por su confianza, por acompañarme siempre, por su magia de hacer lo imposible realidad. Para usted, eternos y nunca suficientes agradecimientos...*

*Gracias a los profesores del laboratorio de Micología del IPK, por su calidad profesional y humana, por sus enseñanzas...*

*A todos los que tuvieron que ver con el impulso..., con este hecho, gracias.*

## SÍNTESIS

La criptococosis se manifiesta principalmente como meningitis. Su agente causal es el complejo de especies *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*. En este estudio se realizó la identificación y caracterización mediante técnicas convencionales y moleculares (amplificación del fragmento *URA5* y secuenciación de la región espaciadora de transcripción inversa de los aislamientos que no amplificaron *URA5*) de las levaduras obtenidas a partir de líquido cefalorraquídeo y sangre recibidas en el Laboratorio de Micología del Instituto "Pedro Kouri" durante un año. Además, los aislamientos se caracterizaron mediante PCR con cebadores específicos y arbitrarios, así como por su sensibilidad a los antifúngicos del juego comercial ATB Fungus 3. Se consultaron las historias clínicas de los pacientes con criptococosis confirmada en busca de datos clínicos y demográficos de interés. Como resultados se obtuvo 14 *C. neoformans*, un *C. gattii* y dos *Candida haemulonii*. Los primeros se corresponden con el serotipo A tipo de apareamiento  $\alpha$ , y que no existe relación epidemiológica entre los mismos. Todos los aislamientos fueron sensibles a la anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol y voriconazol. La revisión de las historias clínicas arrojó predominio de la infección en el sexo masculino, edad media 35,2 años e infección con VIH como principal factor predisponente. Las enfermedades concomitantes predominantes fueron: candidiasis orofaríngea, tuberculosis y neurotoxoplasmosis. El tratamiento administrado estuvo acorde con las normas establecidas, no obstante el porcentaje de recaídas y muertes fueron del 21,4% y 28,57% respectivamente. Adicionalmente se identificaron por métodos convencionales cinco especímenes de *Cryptococcus* spp. obtenidos a partir de 200 detritos vegetales.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>III. MARCO TEÓRICO</b> .....	5
III.1. Definición.....	5
III.2. Antecedentes históricos .....	5
III.3. Agente etiológico.....	9
III.3.1. Características.....	9
III.3.2. Clasificación taxonómica.....	11
III.3.3. Factores de virulencia .....	12
III.4. Epidemiología .....	14
III.4.1. Distribución geográfica .....	15
III.4.2. Nicho ecológico .....	15
III.4.3. Mecanismo de transmisión .....	16
III.5. Patogénesis .....	17
III.6. Manifestaciones clínicas .....	18
III.7. Diagnóstico .....	20
III.7.1. Muestras .....	20
III.7.2. Examen microscópico directo .....	21
III.7.3. Cultivo e identificación .....	21
III.7.4. Serología .....	23
III.7.5. Biología molecular .....	23
III.8. Tratamiento .....	24
III.9. Prevención .....	25
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
IV.1. Marco de la investigación.....	26
IV.2. Diseño de la investigación.....	26
IV.3. Universo y muestra de estudio .....	26

IV.4.	Obtención del material biológico .....	27
IV.5.	Identificación de los aislamientos.....	29
IV.5.1.	Métodos convencionales.....	29
IV.5.1.1.	Pruebas morfológicas .....	29
IV.5.1.2.	Pruebas fisiológicas y bioquímicas .....	29
IV.5.2.	Identificación y caracterización molecular .....	30
IV.5.3.1.	Identificación del complejo <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> mediante amplificación del fragmento <i>URA5</i> .....	30
IV.5.3.2.	PCR específica para la secuenciación de la región espaciadora de transcripción interna (ITS1/5.8S/ITS2) .....	30
IV.5.3.3.	Determinación del tipo de apareamiento.....	31
IV.5.3.4.	Amplificación al azar de ADN polimórfico con el cebador M13 .....	32
IV.6.	Determinación de la susceptibilidad in vitro a antifúngicos .....	33
IV.7.	Recolección de datos clínico-epidemiológicos de los pacientes con diagnóstico confirmado de infección por <i>Cryptococcus</i> .....	34
IV.8.	Análisis estadístico.....	34
IV.9.	Consideraciones ética.....	35
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	36
V.1.	Identificación convencional de las levaduras recuperadas a partir de muestras clínicas y ambientales.....	36
V.2.	Identificación molecular .....	38
V.3.	Caracterización molecular .....	40
V.4.	Resultados obtenidos de la evaluación de la susceptibilidad para los aislamientos previamente identificados como <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> .....	42
V.5.	Datos clínico-epidemiológicos recogidos de las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico confirmado de criptococosis por <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> .....	42

<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXOS</b>	

# INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una enfermedad fúngica que afecta a seres humanos y animales y se manifiesta de forma común como meningitis. Es causada por especies del género *Cryptococcus*, fundamentalmente por el complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* (Casadeval y Perfect, 1998; Fonseca 2011; Bonifaz. 2012).

Actualmente se conoce que *C. neoformans* es una especie con dos variedades que comprenden a su vez tres serotipos: *C. neoformans* var. *Grubii* (serotipo A), *C. neoformans* var. *Neoformans* (serotipo D) y el híbrido *C. neoformans* serotipo AD (Franzot *et al.*, 1999). Estas están asociadas a sustratos orgánicos como las excretas de aves y presentan una amplia distribución mundial (Randhawa *et al.*, 2003). La variedad predominante de esta especie, *C. neoformans* var. *grubii*, es responsable de alrededor del 95% de las infecciones criptococócicas a nivel mundial (Casadevall y Perfect, 1998) y aunque se documentan casos de micosis debido a este agente en pacientes sin enfermedad subyacente, se sabe que afecta en primer lugar a personas con algún grado de deterioro inmunológico (Viviani *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008; Sajadi *et al.*, 2009).

La epidemia de VIH/sida incrementó dramáticamente la incidencia de las poblaciones inmunodeprimidas y de forma paralela la tasa de infección por *Cryptococcus* (Day, 2013; Park *et al.*, 2009). Cada año se diagnostican hasta 1 millón de casos nuevos y más de 600 000 muertes por este agente. A pesar de que estas tasas de mortalidad son comparables a las causadas por la malaria y la tuberculosis, la meningitis criptococócica no recibe la atención, el financiamiento y el control otorgado a las enfermedades más ampliamente reconocidas (Vidal *et al.*, 2000). Esto resulta especialmente cierto para el Sudeste de Asia y Sudáfrica, regiones altamente pobladas donde esta micosis se considera marcadora de sida en el 20 al 30% de los pacientes seropositivos al VIH. Estos pacientes deben someterse a una terapia antifúngica mantenida de por vida o hasta alcanzar la inmunorreconstitución a través de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) (Pitisuttithum *et al.*, 2001).

*Cryptococcus gattii*, la otra especie que integra el complejo, consta de dos serotipos: B y C. También es capaz de formar híbridos con *C. neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 2011). A partir de los últimos años del siglo XX comenzó a considerarse como patógeno primario por afectar más frecuentemente a individuos inmunocompetentes (Hagen y Boekhout, 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2011). Otras de las principales diferencias con su congénere están dadas por causar brotes epidémicos importantes tanto en seres humanos como en animales (Datta *et al.*, 2009). Su principal reservorio natural suele relacionarse con *Eucalyptus*; sin embargo, hallazgos más recientes de *C. gattii* en oquedades de otros muchos géneros de plantas indican que no solo se asocia a estos árboles, sino a los detritos vegetales en general (Chowdhary *et al.*, 2012).

La infección por este patógeno se caracterizaba por presentar una distribución restringida a regiones de clima tropical y subtropical (fundamentalmente en Australia y California) (Severo *et al.*, 2009). No obstante las evidencias más recientes demuestran su expansión a regiones de clima templado como la costa del Pacífico de Estados Unidos de América y Canadá (Datta *et al.*, 2009).

Cada vez se reconoce con mayor fuerza que muchas enfermedades infecciosas humanas surgieron en los últimos 11 000 años a raíz de la aparición de la agricultura y la domesticación de los animales. Un ejemplo de esto lo constituye la especie *C. gattii*, cuya infección sufrió un rápido aumento en zonas no tropicales del Pacífico (Maganti *et al.*, 2011). Inicialmente se pensó que este fenómeno era consecuencia del comercio internacional de árboles, especialmente de eucalipto desde Australia, donde esta especie es muy frecuente. No obstante, los estudios moleculares más recientes sugieren un origen ancestral en la selva amazónica y su expansión a través del aire y animales que actúan como vectores (Byrnes *et al.*, 2009; Hagen y Boekhout, 2010).

En Cuba se reporta una prevalencia de la criptococosis del 7,2% entre los pacientes con VIH/sida (Pérez *et al.*, 1993). Contrario a lo que era de esperarse, a pesar de la introducción de la TARVAE a todos los pacientes cuando se hace necesaria, el

número de casos de criptococosis por *C. neoformans*, diagnosticados en el Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (LM-IPK), se mantiene sin grandes variaciones con una ligera tendencia al incremento progresivo a partir del 2004 (Illnait-Zaragozí *et al.*, 2010a).

A pesar del clima tropical de nuestro país y de la presencia de posibles fuentes naturales de *C. gattii*, hasta el momento solo se conoce como causa de enfermedad fatal en un guepardo (*Acinonyx jubatus*) del Parque Zoológico Nacional. Los datos epidemiológicos disponibles sugieren que la misma pudo importarse con el animal desde Sudáfrica (Polo *et al.*, 2010; Illnait *et al.*, 2011). Estas evidencias no descartan la posibilidad de que esta variedad exista en la isla, lo cual es motivo de constante preocupación por parte de los investigadores del LM-IPK.

En el contexto de la problemática internacional y nacional entorno a la infección criptocócica, se decidió el desarrollo del presente estudio con vistas a profundizar los conocimientos ya existentes en Cuba sobre esta micosis y su agente causal.

# II OBJETIVOS

- Identificar por métodos convencionales las especies de levaduras de origen clínico incluidas en el estudio.
- Aislar e identificar mediante métodos convencionales las levaduras compatibles con *Cryptococcus* spp. obtenidas a partir de detritos vegetales.
- Caracterizar molecularmente los aislamientos clínicos y ambientales identificados de manera presuntiva como *Cryptococcus*.
- Determinar los patrones de susceptibilidad in vitro a antifúngicos de los aislamientos clínicos pertenecientes al complejo *C. neoformans/C. gattii* previamente identificados.
- Describir los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes con diagnóstico confirmado de criptococosis.

# III MARCO TEÓRICO

## III. 1. Definición

La criptococosis, según la sociedad Internacional de Micología Humana y Animal, constituye una micosis sistémica de curso agudo, subagudo o crónico causada generalmente por el complejo de especies *C. neoformans*/*C. gattii*. Las manifestaciones clínicas más frecuentes se asocian a la infección del sistema nervioso central (SNC) y aunque puede afectar a individuos inmunocompetentes se reporta de forma más frecuente en pacientes inmunocomprometidos (Perfect, 2010).

Hasta hace algunos años la enfermedad se conocía como blastomicosis europea, torulosis o enfermedad de Busse-Buschke, nombres que fueron reemplazados por el empleado actualmente, criptococosis (Bonifaz, 2012).

## III.2. Antecedentes históricos

La levadura *Cryptococcus* se describió por primera vez hace más de 125 años. En 1894 Busse y Buschke en Alemania, aislaron por primera vez el agente causal a partir de una lesión semejante a un sarcoma en la tibia de una mujer; a este microorganismo le llamaron *Saccharomyces hominis*. Casi simultáneamente en Italia, en 1895 Sanfelice aisló una levadura encapsulada del jugo de durazno y demostró su patogenicidad por inoculación de animales de experimentación, reconoció la similitud de esta con la aislada por Busse y la llamó *Saccharomyces neoformans*. Este mismo investigador realizó otro aislamiento a partir de la linfa de un buey y lo denominó *Saccharomyces littogenes* (Kwon-Chung et al., 2011; Bonifaz, 2012).

En 1896 Curtis en Francia describió el segundo caso en humanos. Él distinguió al aislamiento obtenido proveniente de un tumor subcutáneo en el triángulo de Scarpa y de un absceso en la región lumbar como *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens*. Más tarde Frothingan logró reproducir la enfermedad en conejillos de india y conejos,

por lo que estableció que este hongo producía enfermedad en animales (Casadevall y Perfect, 1998; Kwon-Chung *et al.*, 2011).

En 1901 Vullemin examinó los aislamientos de Busse, Sanfelice y Curtis y al no poder demostrar la formación de ascosporas ni la fermentación de fuentes de carbono (característico del género *Saccharomyces*) los reclasificó en el género *Cryptococcus* y estableció dos especies: *C. hominis* para el aislamiento de Busse y Curtis y *C. neoformans* para los de Sanfelice (Kwon-Chung *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2011).

Von Han–Smann en 1905, aisló por primera vez el hongo en un caso de meningitis humana, sin embargo el primer caso de meningitis por *Cryptococcus* reconocido como tal en la literatura fue el publicado por Versé en 1914 (Casadevall y Perfect, 1998; Kwon-Chung *et al.*, 2011).

En 1916 Stoddard y Cutler describieron las diferencias clínicas entre criptococosis, blastomicosis y otras micosis pero creyeron de manera errónea, que la cápsula mucoide de los microorganismos eran quistes en el tejido causados por la acción lítica del hongo (histolisis) y lo llamaron *Tórula hystolítica*. Este nombre se hizo popular y llamaron a la enfermedad que producía la leadura torulosis. Ya desde la década del 1950 y sobre todo después de 1970, se determinó la prioridad del nombre *C. neoformans*, el cual es el que se acepta en la actualidad (Dismukes, 2000; Casadevall y Perfect, 1998; Kwon-Chung *et al.*, 2011).

En 1955 Emmons demostró la asociación del microorganismo con excretas de palomas. En su trabajo, este investigador comprobó que los suelos en los que se aisló el hongo, estaban en sitios próximos a nidos de palomas y las excretas de estas aves era un adecuado medio de cultivo para el mismo (Staib, 1985; Fonseca *et al.*, 2011).

Staib, en 1960 dió un gran impulso a los estudios de ecología y hábitat de *Cryptococcus* al describir un medio de cultivo diferencial y selectivo para su recuperación a partir de muestras de origen natural: el agar *Guizotia abyssinica* (alpiste negro) (Staib, 1985; Kwon-Chung *et al.*, 2011). Este sustrato se emplea en la para la recuperación de esta especie a partir de muestras contaminadas tanto clínicas como ambientales (Randhawa *et al.*, 2005; Illnait-Zaragoz *et al.*, 2012).

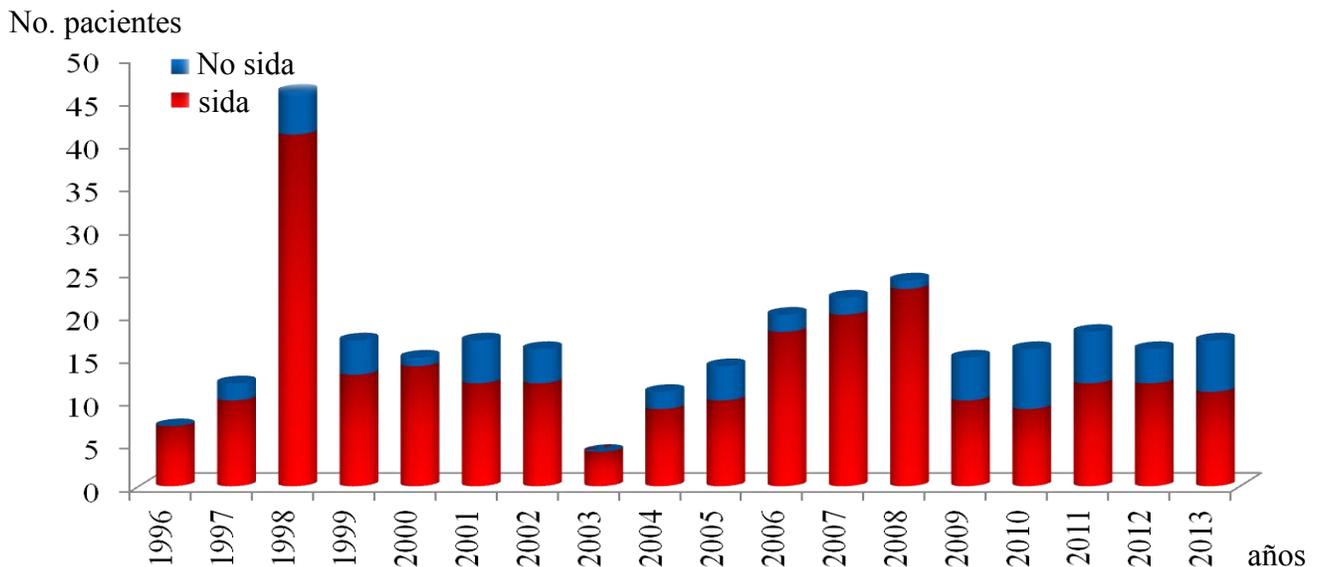
En 1975, como resultado de los estudios de Kwon-Chung quedaron demostrados los estados perfectos de *C. gattii* y *C. neoformans*: *Fillobasidiella bacillispora* y *F. neoformans* respectivamente (Kwon-Chung *et al.*, 1982).

El primer reporte de infección por la especie *C. gattii* se le atribuye Gattii en Zaire en 1966, al obtener el aislamiento de un niño congolés que sufría de meningitis. Sin embargo, no fue hasta 1989 cuando se reportó el primer aislamiento ambiental de este patógeno a partir de un árbol del *Eucalyptus camaldulensis* en Australia (Ellis y Pfeiffer, 1992; Casadevall y Perfect, 1998).

Aunque las infecciones por *C. neoformans* en humanos fueron reportadas a principios de la década de 1900's, los reportes de casos de criptococosis eran escasos. A partir de 1947-1968 se not un incremento en la incidencia de esta micosis en África, presuntamente en asociación con la aparición del sida en la cuenca del río Congo; sin embargo, no hay confirmación o datos de laboratorio disponibles que confirmen esta hipótesis (Drouhet, 1997).

Desde la década de 1950's se reportaron los primeros casos de infección por *Cryptococcus* en Cuba. En 1972, Hernández Cossío publica sus experiencias al describir cinco casos de criptococosis del SNC, en los cuales hay evidencias de la exposición al agente causal relacionado con palomas. En 1973, Sotolongo García estudia seis casos de esta entidad en un período de 10 años, en los cuales hay un 100% de letalidad a pesar del tratamiento impuesto con anfotericina B, al parecer tardíamente (Cossio *et al.*, 1972; Sotolongo, 1973).

A partir de 1980 se notó un incremento en el número de casos de criptococosis en Cuba como micosis oportunista en los enfermos con sida. En 1988 Regalado y cols. notificaron un caso de criptococosis diseminada en un paciente cubano portador del VIH (tomado de Pérez *et al.*, 1993) y desde entonces hasta la fecha se han diagnosticado más de 300 casos en el LM-IPK (dato tomado del libro de registro del LM-IPK); cifra que representa una media de 17 casos anuales y una incidencia del 7,2% en los pacientes con sida (Figura 1). No obstante, Arteaga y cols., después de analizar 211 autopsias realizadas a individuos seropositivos al VIH entre 1986 y 1995, demostraron la presencia de levaduras capsuladas en casi el 30% de los fallecidos (Arteaga *et al.*, 1998).



Fuente: Libro de registro del Laboratorio de Micología, IPK

Figura 1. Número de pacientes con criptococosis por año diagnosticados en el Laboratorio de Micología del IPK.

Aunque la mayoría de los pacientes cubanos afectados por esta levadura son adultos, también se reportan casos de criptococosis en niños. Llama la atención que ninguno de ellos era seropositivo al VIH y que la mayoría carecían de antecedente de

alguna condición inmunosupresora, o datos de laboratorio que permitieran sospechar su existencia en el momento de la infección (Illnait-Zaragozí *et al.*, 2013).

Los estudios realizados en Cuba con aislamientos obtenidos de pacientes y excretas de palomas señalan un predominio de la especie *C. neoformans* (Fernández *et al.*, 1998; Illnait-Zaragozí *et al.*, 2010a; Illnait-Zaragozí *et al.*, 2010b). Otras especies de *Cryptococcus*, también han sido reportadas como responsables de lesiones de piel (Fonseca *et al.*, 2011).

### III.3. Agente etiológico

#### III.3.1. Características

Las células del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* muestran todas las estructuras de una célula eucariota; presentan una pared rígida constituida fundamentalmente por glucano, rodeada por la cápsula integrada por manosa, xilosa, ácido glucurónico, grupos O-acetil (GXM) y al menos dos grupos más de carbohidratos: galactoxilomanano (GalXM) y manoproteínas (MP) (Grinsell *et al.*, 2001). El GXM es el mayor polisacárido tipo específico producido por la levadura y constituye el 88% de la cápsula; es poco inmunógeno por si solo pero conjugado a portadores proteicos es capaz de desencadenar respuesta de anticuerpos (Mitchel y Perfect, 1995). Puede permanecer en los tejidos de los hospederos por largos períodos debido a la ausencia de enzimas capaces de degradarlo (Casadevall y Perfect, 1998). El GalXM y las MP constituyen el 12% restante de la cápsula. Su estructura inmunoquímica permite la diferenciación en cinco serotipos: A, D y AD para la especie *C. neoformans* así como B y C para *C. gattii* (Champa *et al.*, 2009).

Ambas especies presentan dos tipos de reproducción: una sexuada o anamorfa y otra sexuada o telemorfa. La morfología de esta última está dada por hifas delgadas, septadas con conexiones en gancho y basidios subglobulosos localizados en el

ápice, los cuales miden de 10 - 70  $\mu\text{m}$  de ancho cerca de la base y de 4 - 10  $\mu\text{m}$  de ancho en el ápice. Sobre el basidio se observan hileras de basidiosporas terminales y sésiles en disposición canicular (Bonifaz, 2012). En esta fase se identifican dos tipos de hifas: *MAT $\alpha$*  y *MATa* con dos sistemas de apareamiento alelo. A nivel mundial predominan las células *MAT $\alpha$*  tanto en muestras ambientales como clínicas (Tay *et al.*, 2006). Una excepción es el híbrido AD, ya que el 68% de los aislamientos de este serotipo poseen el alelo *MATa* del serotipo A y el *MAT $\alpha$*  del serotipo D. Esta diferencia en la prevalencia del tipo de apareamiento se observa también en otros hongos patógenos como *Histoplasma capsulatum* y varias especies de dermatofitos (Simwami *et al.*, 2011).

La fase asexual se multiplica mediante gemaciones o brotes, y pueden presentar uno o más blastoconidios unidos a la célula madre mediante un cuello estrecho y corto. En el caso de *C. neoformans*, las células suelen ser ovals y miden de 3,5 - 20  $\mu\text{m}$  de diámetro; mientras, las de *C. gattii* se caracterizan por ser alargadas en forma de cigarro (Bonifaz, 2012; Fonseca *et al.*, 2011).

Este microorganismo necesita requerimientos nutricionales simples: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, pequeñas cantidades de sales inorgánicas y no requiere suplementos vitamínicos por lo que se desarrolla en medios de cultivo habituales como el agar dextrosa de Sabouraud, el agar extracto de levadura y el agar infusión cerebro-corazón. Es inhibido por la cicloheximida y su velocidad de crecimiento está condicionado por la temperatura, el pH y el oxígeno, entre otros factores (Fonseca *et al.*, 2011).

Forma colonias mucoides, limitadas, convexas, brillantes, de color blanco crema con aspecto de leche condensada. Cuando se siembra en medios de cultivo con sustratos fenólicos genera pigmentos de color café-marrón, debido a que transforma estos compuestos en un polímero de estructura química similar a la melanina (Staib, 1985; Randhawa *et al.*, 2005; Fonseca *et al.*, 2011).

El complejo de especies puede identificarse con pocas pruebas bioquímicas: asimilación de inositol, creatinina, nitrato de potasio; producción de ureasa, ausencia de enzimas fermentativas, producción de pigmentos en presencia de sustratos fenólicos y crecimiento a 37 °C. No obstante, el perfil bioquímico presenta algunas diferencias según la especie. *C. gattii* resiste bajas concentraciones tanto de cicloheximida como L-canavanina, asimila rápidamente la creatinina y utiliza la glicina como única fuente de carbono. Sin embargo, la cicloheximida y la L-canavanina resultan muy tóxicas para *C. neoformans*, quien además difiere por su habilidad de asimilar ácidos como el fúmarico, el L-málico y el succínico (Fonseca *et al.*, 2011; Kwon-Chung *et al.*, 2011).

La disponibilidad actual de herramientas moleculares permitió la diferenciación de ocho tipos genéticos: VNI y VNII (serotipo A), VNIII (serotipo AD), VNIV (serotipo D), VGI, VGII, VGIII y VGIV (serotipos B y C). Estos tipos moleculares además de correlacionarse con los serotipos, parecen tener relación con la virulencia, la susceptibilidad a los antifúngicos y distribución geográfica (Meyer *et al.*, 2003; Bovers *et al.*, 2008).

**III.3.2. Clasificación taxonómica (de Hoog *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2011).**

Nivel	Fases							
	Asexuada				Sexuada			
<b>Clase</b>	<i>Deuteromycetes</i>				<i>Basidiomycetes</i>			
<b>Sub-clase</b>	<i>Blastomycetidia</i>				<i>Teliomycetidia</i>			
<b>Orden</b>	<i>Cryptococcales</i>				<i>Ustilaginales</i>			
<b>Familia</b>	<i>Cryptococcaceae</i>				<i>Ustiginaciae</i>			
<b>Género</b>	<i>Cryptococcus</i>				<i>Fillobasidiella</i>			
<b>Especie</b>	<i>neoformans</i>		<i>gattii</i>		<i>neoformans</i>		<i>bascillispora</i>	
<b>Variedades (serotipos)</b>	<i>grubii</i> (A)	<i>neoformans</i> (D)	(AD)	(B y C)	<i>grubii</i> (A)	<i>neoformans</i> (D)	(AD)	(B y C)

### III.3.3. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son aquellos que posibilitan al microorganismo sobrevivir en el interior del hospedero y causar la enfermedad. La severidad de la infección dependerá de la acción simultánea de varios de estos mecanismos, de la cuantía del inóculo y el estado inmunológico del huésped (Buchanan y Murphy, 1998).

La virulencia de *Cryptococcus* difiere entre los genotipos. Esto, y la aparición de linajes emergentes altamente virulentos están cambiando los patrones de la enfermedad, en cuanto al clima y al área en que aparecen (Simwami *et al.*, 2011). Entre los factores más importantes de este agente se destacan:

- **Cápsula polisacáridica:** Es considerado el de mayor relevancia debido a su capacidad de inhibir la fagocitosis de la levadura por parte de las células del sistema inmune ya que la cápsula le proporciona al microorganismo una carga fuertemente negativa que provoca repulsión electrostática de las células efectoras del sistema inmune. Con este efecto impide la acción de las células efectoras y altera la presentación del antígeno a los linfocitos T CD4. En animales de experimentación se demostró que los especímenes capsulados son más virulentos y que este efecto es directamente proporcional al tamaño de la cápsula (es tres veces mayor en los aislamientos capsulados que en los no capsulados). Al menos cuatro genes están involucrados en la síntesis de los constituyentes capsulares; estos fueron denominados *CAP10*, *CAP59*, *CAP60* y *CAP64*. La delección de cualquiera de ellos da lugar a mutantes acapsulares con menor virulencia (Barreto de Oliveira *et al.*, 2004).

Durante la infección diseminada el polisacárido capsular es liberado y se acumula en los tejidos del hospedero, donde además de inhibir la fagocitosis, participa en la inducción de edema cerebral, la exacerbación de la infección por el VIH, la no respuesta de anticuerpos, la disregulación de la secreción de

citiosinas, así como en la inhibición de la migración leucocitaria (Casadevall y Perfect, 1998).

- Síntesis de melanina: Una de las características que diferencian los aislamientos patógenos de los no patógenos es la elaboración de un pigmento color café en medios de cultivo que contienen sustratos fenólicos. Esta observación fue sustentada por análisis genéticos que asocian la virulencia con la producción de fenoloxidasa, enzima que utiliza catecolaminas (noradrenalina, dopamina) como sustratos para melanogénesis. Esta característica se relaciona con el marcado neurotropismo de *Cryptococcus* (Casadevall y Perfect, 1998). Polacheck y cols. observaron que una mutante carente de fenoloxidasa fue destruida por el sistema oxidativo de la adrenalina en presencia de un ion metálico y peróxido de hidrogeno, mientras el tipo salvaje fue resistente; esto sugirió que la fenoloxidasa puede consumir adrenalina y proteger a estas levaduras en el SNC. Adicionalmente, la melanina tiene efectos antioxidantes, mantiene la integridad de la pared celular, interfiere con la acción de los linfocitos T, reduce la susceptibilidad a agentes antifúngicos, protege de las temperaturas extremas y enmascara las levaduras depositándose en su superficie, con lo cual inhibe la opsonización por anticuerpos específicos (Casadevall y Perfect, 1998).
- Biotipo de apareamiento: El análisis del tipo de apareamiento en estos microorganismos, resulta relevante ya que se ha demostrado que las células *MAT $\alpha$* , además de encontrarse en mayor proporción tanto en muestras clínicas como ambientales, se asocian a mayor virulencia y tendencia a la diseminación al SNC que sus congéneres *MAT $\alpha$*  (Litvintseva y Mitchell, 2009; Metin *et al.*, 2010; del Poeta y Casadevall, 2011).
- Producción de manitol: Las altas concentraciones de manitol en el SNC contribuyen a través del efecto osmótico, a la producción del edema cerebral que se observa en la meningitis criptocócica. Otro de sus efectos está

relacionado con la neutralización de radicales hidroxílicos que protegen a la levadura de compuestos tóxicos producidos durante la fagocitosis (Nosanchuk *et al.*, 2001).

- Otros factores implicados en la virulencia comprenden: la capacidad de adaptarse a la temperatura del cuerpo humano (37 °C), la utilización de hierro y la producción de enzimas como las fosfolipasas, ureasa, proteinasas, superoxidodismutasa fundamentalmente (Casadevall y Perfect, 1998). Más recientemente se reconocieron otros atributos que contribuyen al poder patogénico de estas levaduras; entre ellos, los cambios en la morfología (desde la formación de filamentos durante el apareamiento hasta la expansión de la cápsula y del tamaño celular en respuesta a determinados factores del hospedador durante la infección) y la formación de biopelícula (Kozubowski y Heitman, 2011; Kronstad *et al.*, 2011).

### III.4. Epidemiología

Se han logrado importantes avances en el campo de los agentes antimicrobianos y el desarrollo de vacunas; sin embargo, las infecciones emergentes y re-emergentes en los seres humanos, el ganado y las plantas son aun cargas graves en la salud y la economía. Hay varios factores que influyen en estos procesos. Entre los más importantes se encuentran la globalización y el aumento de la población de huéspedes inmunocomprometidos (Nosanchuk *et al.*, 2001). Estos impactaron significativamente en la aparición de infecciones fúngicas sistémicas durante las últimas dos décadas, en gran parte debido al uso generalizado de antibióticos de amplio espectro, los avances en la atención sanitaria y la pandemia del VIH (Cowen, 2013). Este es el caso de la criptococosis cuya incidencia a nivel mundial aumentó hace algunas décadas hasta nuestros días.

**III.4.1. Distribución geográfica**

Históricamente, los casos humanos de criptococosis a nivel mundial se atribuyen principalmente a *C. neoformans*. Por el contrario, las infecciones por *C. gattii* ocurren generalmente con menor incidencia y suele limitarse a las regiones tropicales y subtropicales, donde es endémica. Sin embargo, desde 1999 cientos de infecciones por esta especie se identificaron en Canadá y en el noroeste de Estados Unidos, lo que se ha dado a conocer como el mayor brote epidémico de infección fúngica conocido hasta la fecha. Este hecho constituye un cambio en la distribución ecológica de la especie; adicionalmente, los estudios de proliferación intracelular de macrófagos murinos y ensayos en modelos animales, sugieren que dichos aislamientos son más virulentos en comparación con las restantes de su especie (Lin y Heitman, 2006).

**III.4.2. Nicho ecológico**

La especie *C. neoformans* se aísla de las más disímiles fuentes naturales (del suelo, el aire, el agua, de la leche cruda y sus derivados, frutas cítricas, verduras tales como habichuelas, remolachas, coles, rábanos, lechugas, tomates y en algunos tubérculos como la papa). No obstante, el mayor número de aislamientos se reporta a partir de excretas de aves, especialmente de palomas domésticas (*Columba livia*), por lo que este constituye su nicho ecológico más importante entre los conocidos (Casadevall y Perfect, 1998; Kwon-Chung *et al.*, 2011). Esta ave, originaria de África, es considerada como portadora mecánica y dispersora potencial de *C. neoformans*, que aunque es incapaz de colonizarlas, sobrevive a las temperaturas elevadas dentro de su tractogastrointestinal (41 - 42 °C). Sus heces constituyen una fuente ambiental común de esta levadura donde puede permanecer viable hasta dos años (Chae *et al.*, 2012). No obstante, los reportes cada vez más frecuentes de *C. neoformans* a partir de más de 20 especies de árboles de diferentes familias y géneros así como la presencia de enzima lacasa (degradadora de lignina), hacen

suponer que su nicho ecológico primario pudieran ser las plantas (Lazera *et al.*, 2000).

El nicho ecológico de *C. gattii* fue un enigma hasta 1990 cuando los investigadores australianos Ellis y Pfeiffer describieron por primera vez su asociación con *Eucalyptus camaldulensis*. Ellos confirmaron la presencia de basidiosporas, suspendidas en el aire próximo a estos árboles y sugirieron que en ese reservorio podía ocurrir la reproducción sexual y consecuentemente la diseminación de propágulos al ambiente (Ellis y Pfeiffer, 1992). Posteriormente se demostró que dicha asociación no está restringida a un tipo de árbol o a un área geográfica en particular (Lazera *et al.*, 2000; Kidd *et al.*, 2007). Los reportes de su aislamiento a partir de guano de murciélago, en Brasil y de insectos, contribuyeron al mejor conocimiento de la diversidad de sus fuentes naturales que, curiosamente, no incluyen excretas de aves o suelos contaminados (Hamasha *et al.*, 2004).

#### III.4.3. Mecanismo de transmisión

Los estudios ambientales realizados demuestran la existencia de partículas viables de *C. neoformans/C. gattii* de tamaño comparable con aquellas que son capaces de llegar a los alvéolos (menores de 5  $\mu\text{m}$ ). Este hecho facilita la entrada del microorganismo por vía aérea a partir de la inhalación de partículas o aerosoles que contengan células viables del hongo (Casadevall y Perfect, 1998; Bonifaz, 2012).

Otras vías de entrada menos frecuentes son la mucocutánea a través de traumatismos que generalmente producen lesiones localizadas y otras como la transplacentaria y la digestiva. Esta última es la menos probable debido a la sensibilidad de este microorganismo a la acción de las lisozimas de la saliva y al pH de los jugos gástricos (Bonifaz, 2012). La transmisión de persona a persona es excepcional y solo se ha evidenciado en individuos con trasplante de córnea, riñón u otros órganos sólidos. Los reportes de transmisión de animal a persona son escasos; sin embargo resulta importante tenerlo en cuenta ya que la enfermedad también

afecta a animales tales como gatos, perros, ganado vacuno y diferentes mascotas (Török *et al.*, 2010; Litvinseva *et al.*, 2005).

### III.5. Patogénesis

La patogénesis de la enfermedad esta dada por tres factores: el estado del sistema inmune del hospedero, la virulencia del aislamiento y la cuantía del inóculo (del Poeta y Casadevall, 2011).

Las basidiosporas inhaladas llegan a los alvéolos atravesando las vías respiratorias, donde pueden ser fagocitadas por los mácrofagos. Algunos microorganismos evaden la digestión y continúan multiplicándose en el interior de estas células por tiempo indefinido. De esta forma se genera la primoinfección pulmonar, generalmente asintomática o subclínica (Kwon-Chung *et al.*, 2011). Si la dosis infectante es tan elevada que desborda las defensas celulares normales o no hay una adecuada respuesta celular, se produce una rápida proliferación del hongo que se disemina por vía hemática y linfática a sitios extrapulmonares, fundamentalmente al SNC debido al tropismo que presenta el hongo por este sistema (Casadevall, 2010)

Las bases del neurotropismo no están bien dilucidadas, pero pudieran involucrar la evasión selectiva de las defensas del huésped o a la presencia en estos tejidos de catecolaminas, excelentes sustratos para la enzima fenoloxidasa. Adicionalmente, la barrera hematoencefálica excluye de manera efectiva las moléculas de proteínas como anticuerpos y factores del complemento, los cuales son esenciales en la opsonización eficiente del hongo. Se plantea que las microglías residentes en el SNC son capaces de fagocitar al microorganismo pero esto es críticamente dependiente de las opsoninas. En este sistema las lesiones se desarrollan por lo general en las meninges, nervios craneales, tallo cerebral y cerebelo, provocando meningoencefalitis subaguda o crónica. A partir de este foco puede ocurrir

diseminación a otras vísceras, la piel y los huesos (Dismukes, 2000; Casadevall, 2010; Bonifaz, 2012).

Adicionalmente, Rohatgi et al. demostraron que el polimorfismo FCGR3A 158 F/V incrementa en 20 veces el riesgo de desarrollar criptococosis en los individuos homocigóticos (Rohatgi et al., 2013). Estos hallazgos sugieren que los factores genéticos humanos también tienen un impacto importante en la patogenia de esta micosis (Netea, 2013)

### III.6. Manifestaciones clínicas

En general, la criptococosis puede ocurrir a partir de la progresión de la enfermedad primaria en el contexto de la inmunosupresión o a partir de la reactivación de una infección subclínica latente. La progresión de la infección y la aparición de la enfermedad dependen de una interacción compleja de factores relacionados con el huésped y el microorganismo (Gazzoni et al., 2010).

Las manifestaciones clínicas son similares tanto en los pacientes inmunocomprometidos como en los inmunocompetentes. No obstante, las infecciones por *C. gattii* pudieran distinguirse por su mayor tendencia a producir lesiones tumorales (criptocomas), mayor compromiso neurológico y una respuesta más retardada al tratamiento. A pesar de estas diferencias, la presentación de la enfermedad responde, independientemente del agente causal, al órgano más afectado (Török et al., 2010).

Debido a la diversidad de órganos y tejidos que se pueden afectar por la presencia del hongo en el curso de la enfermedad, se hace necesario establecer las diferentes formas clínicas de esta entidad para su mejor estudio (Bonifaz, 2012).

### **Criptococosis del SNC.**

- Meningitis: Puede tener un curso subagudo o rápidamente progresivo, la mayoría de los pacientes refieren cefalea intermitente frontal, temporal o retroorbitaria, con severidad y frecuencia creciente. La fiebre es de grado variable, acompañada de cambios mentales. Otras manifestaciones tales como convulsiones, rigidez de nuca, papiledema, toma de pares craneales etc pueden aparecer también.
- Meningoencefalitis: Es la forma mas común y fulminante. Conduce a menudo al coma y la muerte en corto tiempo, en algunos pacientes esto se evita con el diagnóstico temprano y el tratamiento apropiado.
- Criptococoma: Puede producir solamente signos relacionados con la masa intracraneal creciente: náuseas, vómitos, cambios mentales, parálisis, alteraciones oculares tales como fotofobia, diplopía y nistagmo. Estos signos aumentan gradualmente su severidad, terminando con postración y coma.

### **Criptococosis pulmonar**

Alrededor del 95% de los casos son asintomáticos o subclínicos. Los casos sintomáticos leves por lo general desarrollan tos, aumento de la temperatura y discreto dolor pleural; los más graves suelen presentar fiebre persistente, pérdida de peso, astenia, adinamia y tos con esputo hemoptoico. Habitualmente las lesiones son bilaterales, no da lugar a adenopatías hiliares y no afectan el mediastino. En el menor número de casos puede aparecer como neumonía o criptococomas.

### **Criptococosis mucocutánea**

La forma primaria, es una forma rara y se debe a la inoculación del hongo a través de una solución de continuidad queda lugar a un complejo primario constituido por adenitis y linfangitis. La secundaria, es más común y se origina a partir de una

criptococosis pulmonar o meníngea que se disemina por vía hematológica y se manifiesta por lesiones papuloacneiforme, abscesos y úlceras.

### **Criptococosis ósea y articular**

Es una forma relativamente frecuente. Se origina a partir de focos pulmonares y tiene predilección por los huesos largos, vértebras y huesos craneales. Las artritis se localizan preferiblemente en las rodillas, aunque se describen casos de tomas múltiples.

### **Criptococosis diseminada o visceral**

Se presenta generalmente en pacientes con sida avanzado o con una profunda inmunodepresión inducida por esteroides. Se producen lesiones granulomatosas en los ojos, la próstata, el hígado, el bazo, el corazón, las glándulas suprarrenales, los ganglios linfáticos, los intestinos y los riñones.

## **III.7. Diagnóstico**

El diagnóstico de criptococosis con frecuencia se basa en la microscopía directa, cultivo de muestras clínicas y la detección de antígeno específico en los fluidos corporales (Mc Taggart *et al.*, 2011; McMullan *et al.*, 2012).

### **III.7.1. Muestras**

El material más frecuentemente procesado es el líquido cefalorraquídeo (LCR). También resultan útiles en dependencia de la localización de la lesión la sangre, orina, lavados bronquio-alveolares, tejido subcutáneo, biopsia y material de abscesos (Perfect, 2013; Llop *et al.*, 2001).

### III.7.2. Examen microscópico directo

El LCR, la orina y los lavados bronquiales se centrifugan y el sedimento se observa con una preparación de tinta china o nigrosina directamente en el microscopio. La presencia de células levaduriformes encapsuladas es fácilmente identificable al no teñirse la cápsula del microorganismo. Las levaduras se presentan con gemaciones o no. La observación de esta imagen en preparaciones de muestras procedentes de lesiones cerradas o del LCR, prácticamente establece el diagnóstico. Otros colorantes y soluciones útiles para el examen directo de estas muestras son la naranja de acridina y el blanco de calcofluor (Gazzoni *et al.*, 2010; Yugueros y Pincus, 2013).

En cortes histopatológicos por lo general se utilizan coloraciones con hematoxilina y eosina o Papanicolau, pero debido a que las células frecuentemente son encapsuladas se recomienda utilizar tinciones específicas para la cápsula como la mucicarmina y del ácido periódico de Schiff. Otras coloraciones para este tipo de muestras son las de Grocot o plata menetenamina (Gazzoni *et al.*, 2010; Perfect, 2013).

### III.7.3. Cultivo e Identificación

Tanto la hidrólisis de la urea como la detección de la producción de melanina son características claves que distinguen a *C. neoformans* y *C. gattii* de otras especies de *Cryptococcus* y otras levaduras (Lin y Heitman, 2006; Fonseca *et al.*, 2011).

El cultivo puede realizarse en agar dextrosa de Sabouraud, agar cerebro-corazón, agar extracto de malta, agar sangre y agar chocolate. *C. neoformans* es sensible a la cicloheximida, por lo que no deben utilizarse medios que la contengan. La temperatura de incubación óptima es de 28 °C a 30 °C y con frecuencia se utiliza además la temperatura de 37 °C. Las colonias aparecen entre 2 y 5 días y suelen ser

lisas, de aspecto mucoso, brillantes, de color blanco a crema, de varios milímetros de diámetro (Llop *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2011).

Cuando provienen de especímenes clínicos muy contaminados o muestras de origen saprófito, es conveniente utilizar un medio que contenga compuestos fenólicos como el agar ácido cafeico, agar semilla de alpiste negro y el agar extracto semillas de girasol. Estos resultan de gran utilidad para su identificación ya que en dichos medios las colonias de *C. neoformans*/*C. gattii* producen coloración oscura (marrón) (Fonseca *et al.*, 2011).

La identificación se realiza teniendo en cuenta el aspecto macroscópico y microscópico del cultivo, la capacidad de crecer a 37 °C, la no producción de pseudomicelio y la determinación a través de pruebas bioquímicas de algunas actividades de metabolismo como: la producción de ureasa, la asimilación de inositol y creatinina, la hidrólisis de almidón y la incapacidad de fermentar los carbohidratos. Adicionalmente se puede emplear la inoculación en animales para demostrar el carácter patogénico del aislamiento (Llop *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2011).

Una de las características bioquímicas que distingue *C. gattii* de *C. neoformans* es su capacidad para inducir cambio de coloración (del amarillo al azul) en el medio de cultivo L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), aunque en ocasiones, algunos aislamientos identificados como *C. gattii* mediante métodos moleculares han mostrado una reacción negativa sobre este sustrato (McTaggart *et al.*, 2011). Por otra parte, algunos autores reportan que entre el 30 y el 76% de otras especies de *Cryptococcus* diferentes del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* son capaces de desarrollar una reacción positiva sobre este agar (Tay *et al.*, 2008; Illnait-Zaragozí *et al.*, 2012)

#### III.7.4. Serología

Para la determinación de anticuerpos específicos circulantes se cuenta en la actualidad con la inmunofluorescencia indirecta, la aglutinación en tubo y la fijación del complemento. No obstante, su mayor utilidad radica en la evaluación del pronóstico de la enfermedad y de la eficacia del tratamiento (Perfect, 2014; Teles y Seixas, 2014).

En la actualidad existen diferentes técnicas serológicas basadas en la determinación de anticuerpos específicos circulantes y la búsqueda y cuantificación del antígeno polisacárido en fluidos biológicos que proporcionan rapidez en el diagnóstico (McMullan *et al.*, 2012; Teles y Seixas, 2014). Estas son de gran utilidad en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Una de las más empleadas es la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos anticriptococos la cual se aplica a todos los líquidos corporales (LCR, suero, orina, etc). Más recientemente se introdujo en el mercado el sistema rápido de flujo lateral para la detección de antígeno el cual se encuentra actualmente en evaluación con excelentes resultados (McMullan *et al.*, 2012). El mismo resulta estable a temperatura ambiente, ofrece resultados en solo 10 minutos y no necesita equipamiento ni personal previamente entrenado (Boulware *et al.*, 2014).

#### III.7.5. Biología molecular

Las herramientas moleculares son esenciales en la identificación y los estudios epidemiológicos de *C. neoformans/C. gattii*. Para esto se utilizan en la actualidad técnicas tales como el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, de sus siglas en inglés), el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, de sus siglas en inglés), la secuenciación de los espaciadores internos de transcripción (ITS, de sus siglas en inglés) y más recientemente, el análisis de fragmentos cortos de repetición (STR, de

sus siglas en inglés), la tipificación de secuencia de multilocus (MLST) entre otras (McTaggart *et al.*, 2011).

Algunos autores proponen el análisis de secuencia de ADN para identificar *C. neoformans* y *C. gattii*; sin embargo, los objetivos de secuenciación tradicionales, tales como la región ITS y D2 de la subunidad ribosómica mayor, muestran más de un 99% de similitud entre las especies y subespecies. Esto sugiere el empleo de métodos moleculares especializados con más poder discriminatorio, tal como el espaciador de RNA intergénico (IGS) el cual pudiera ser más útil en la diferenciación de aislamientos hasta nivel de subespecie (Lin y Heitman, 2006).

### **III.8. Tratamiento**

Los datos clínicos sugieren que la respuesta a la terapia antifúngica es más lenta en la infección por *C. gattii* que en *C. neoformans* lo que pudiera explicar por qué el primero requiere tratamientos más prolongados. Esto es corroborado por diferentes estudios *in vitro* los que evidencian una menor susceptibilidad de esta especie a los antifúngicos, en particular al fluconazol (Datta *et al.*, 2009).

El esquema de tratamiento se utiliza en la actualidad, teniendo en cuenta varios aspectos como son la gravedad del caso, la localización de la infección y sobre todo el estado inmune del paciente. En sentido general se recomienda la terapia combinada con anfotericina B y 5-fluorocitosina pero además pueden usarse otros antifúngicos como el fluconazol o el itraconazol que por lo general se indican durante dos semanas o hasta que exista una mejoría clínica. Como terapia de consolidación suele recomendarse el fluconazol por al menos ocho semanas (Perfect *et al.*, 2014; WHO, 2011).

La reducción o eliminación del tratamiento esteroideo siempre que sea posible cuando existe, la administración de interferón ganma, la administración intratecal o intraventricular de anfotericina B y la excéresis de las lesiones han sido alternativas empleadas en casos de fallo terapéutico. La estrategia optima para el manejo de la hipertensión intracraneal no está bien establecida pero las evidencias indican que el drenaje ofrece los mejores resultados ([Perfect et al., 2010](#); [Török et al., 2010](#)).

Se recomienda que a los pacientes infectados con VIH que presentan conteos de células CD4  $\leq 200$  células /mL, se les administre fluconazol o itraconazol hasta lograr un conteo normal de estas células. En países con incidencia de criptocosis menor del 10% se debe valorar el costo, el riesgo de aparición de aislamientos resistentes vs el incremento en la supervivencia ([Perfect et al., 2010](#)).

### III.9. Prevención

A pesar del incremento del arsenal antifúngico, el inicio temprano de la TARVAE constituye la estrategia preventiva más efectiva para reducir la incidencia de la criptocosis y la elevada mortalidad asociada a esta micosis en los pacientes seropositivos al VIH. No obstante, antes de iniciar esta terapia, se recomienda descartar la presencia de antígeno criptocócico en el suero o plasma de los pacientes; en caso de ser detectado se deben realizar pruebas confirmatorias y tratar la micosis ([WHO, 2011](#)).

# IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1. Marco de la investigación

El trabajo se desarrolló en el LM-IPK en el período de noviembre 2011 a diciembre 2013. El mismo tuvo como antecedentes los estudios de prevalencia de *C. neoformans* en muestras ambientales (Illnait-Zaragozí *et al.*, 2010b) así como los relacionados con los aislamientos clínicos obtenidos durante el servicio de diagnóstico y referencia que se realiza en dicho laboratorio desde hace más de 20 años (Torres, 2002).

### IV. 2. Diseño de la investigación

Se realizó un estudio longitudinal descriptivo. El mismo comprendió la identificación y caracterización de levaduras causantes de criptococosis sistémica o profunda, la determinación de los aspectos microbiológicos y clínico-epidemiológicos de interés relacionados con esta entidad entorno a los aislamientos incluidos en el presente estudio, así como la identificación de levaduras de este género recuperadas a partir de muestras ambientales (detritos vegetales). Durante su realización se siguió la secuencia de trabajo según aparece en el anexo 1.

### IV.3. Universo y muestra de estudio

Estuvo compuesto por 25 aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de LCR y hemocultivos recibidos en el LM-IPK como parte del servicio de diagnóstico y referencia procedentes del área de hospitalización del propio IPK así como de otros hospitales de La Habana y provincias de Cuba.

Para el estudio ambiental se recolectaron 200 muestras de 146 ejemplares adultos de plantas con cavidades o ranuras profundas en el tronco que se encontraban en áreas públicas de los municipios Playa y La Lisa, La Habana. Quedaron incluidos: 28

ocujes (*Callophyllum inophyllum*), 29 almendros de la India (*Terminalia cattapa*), 16 majaguas (*Talipariti elatum*), 13 mangos (*Manguifera indica*), 9 flamboyanes (*Delonix regia*), 15 robles blancos (*Tabebuia pentaphylle*), 13 chefleras (*schefflera arboricola*), 12 tulipanes africanos (*Spathodea campanulata*) y una de cada una de las siguientes especies: casuarina (*Casuarina equisetifolia*), uva caleta (*Coccoloba uvifera*), tamarindo (*Tamarindus indica*), zapote (*Diospyros digyna*), anón (*Annona squamosa*), guanábana (*Annona muriceta*), mamey (*Pouteria sapota*), aguacate (*Persea americana*), cocotero (*Cocos nucifera*), guásima (*Guazuma ulmifolia*) y algarrobo (*Prosopis* sp.).

#### IV.4. Obtención del material biológico y preparación del banco de trabajo

Aislamientos de muestras clínicas: Estos se encontraban conservados a temperatura ambiente en tubos con agar dextrosa de Sabouraud simple (ADSS) (anexo 2) y se procesaron según los procedimientos de operaciones normalizados en el LM-IPK. Previo al estudio se transfirieron mediante siembra por estrías de máximo agotamiento a placas de Petri con el mismo sustrato, con el fin de comprobar la pureza y viabilidad de los cultivos.

Aislamientos de muestras ambientales: Para la recolección de las muestras ambientales se utilizaron frascos plásticos de boca ancha con tapa de rosca estériles y cucharilla de metal. Las mismas se obtuvieron mediante recolección de aproximadamente 1-3 g de detritos acumulados en las oquedades y ranuras detectadas a una altura  $\geq 1$  m con relación al suelo en el tronco de los árboles. Las muestras se transportaron al LM-IPK y se procesaron en un tiempo no mayor de 24 h, según lo descrito en la literatura consultada ([Randhawa et al., 2005](#)). Brevemente, se pesó 1 g de materia orgánica y se suspendió en 10 mL de solución salina estéril (SSE) que contenía 25 mg/L de gentamicina, se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 30 min, a partir del sobrenadante se preparó una dilución 1:10 en SSE y se inocularon 100  $\mu$ L en placas de Petri con medio mínimo de agar ácido

caféico (AAC) (anexo 2)(Vidotto *et al.*, 2004). Cada muestra se sembró por duplicado y las placas se mantuvieron en la oscuridad a 35 °C hasta 10 días. Mediante examen estereoscópico diario se seleccionaron las colonias con características morfológicas compatibles con las producidas por las levaduras del género *Cryptococcus* (colonias redondas, superficie lisa, húmedas con aspecto cremoso y consistencia mucoide o no, bordes regulares, color del beige a carmelita intenso)(Randhawa *et al.*, 2005).

Cepas controles: Hasta el momento del estudio, las mismas se encontraban conservadas en agua destilada estéril a temperatura ambiente. Se emplearon para garantizar la calidad de los procedimientos según se muestra a continuación.

Cepa	Código	Empleada en:
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (A)	NIH 18 A	Tubo germinativo (-) Filamentación (-) Termotolerancia a 37 °C (R) Prueba de urea (+) Asimilación de fuentes de carbono (*) Fenoloxidasa (+) CGB (-) Amplificación de <i>URA5</i> Amplificación de <i>STE20</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (D)	NIH 52 D	CGB (-)
<i>C. gattii</i> (B)	LM-IPK 0135	CGB (+)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	LM-IPK 027	Termotolerancia (S)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	Tubo germinativo (+) Filamentación (+) Prueba de urea (-) Asimilación de fuentes de carbono (*) Fenoloxidasa (-)

**NIH** = código de la colección de la Unidad de Micología del Instituto Pasteur, París; **LM-IPK** = código del LM-IPK, La Habana; **ATCC** = código de la Colección de Cultivos Tipos, EEUU; (\*) = según el patrón de crecimiento (de Hoog *et al.*, 2009); **CGB** = agar canavanina-glicina-azul de bromotimol; **(+)** = positivo; **(-)** = negativo; **(S)** = sensible; **(R)** = resistente

Preparación del banco de trabajo: Los cultivos incluidos en este trabajo se transfirieron de forma independiente a placas con ADSS mediante estría de máximo agotamiento sobre la superficie del medio y se incubaron a 28 °C durante 48 – 72 h. De cada placa, se tomó una colonia aislada la cual fue replicada sobre 3 cuñas de ADSS que se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

### IV.5. Identificación de los aislamientos

#### IV.5.1. Método convencional

**IV.5.1.1. Pruebas morfológicas:** Comprendió el examen macroscópico y estereoscópico las colonias en las placas de ADSS para evaluar las características culturales y descartar la posibilidad de asociación de más de un microorganismo levaduriforme. Una vez seleccionados los cultivos con características compatibles con *Cryptococcus* spp. se realizó: i) examen microscópico directo entre cubre- y porta- objetos con agua destilada (Koneman y Robert, 1987), ii) prueba de formación de tubos germinativos (McGinnis, 1980) y iii) estudio de filamentación (Koneman y Robert, 1987) las cuales se detallan en el anexo 3.

**IV.5.1.2. Pruebas fisiológicas y bioquímicas:** Comprendió la i) detección de la capacidad de crecer a temperaturas críticas (Rippon, 1998), ii) la producción de ureasa (Koneman y Robert, 1987), iii) la producción de fenoloxidasa (Kwon-Chung *et al.*, 2011), iv) la capacidad de asimilar glucosa, galactosa, lactosa, inositol, maltosa, celobiosa, rafinosa, melibiosa, trehalosa, melizitosa y xilosa (McGinnis, 1980) y v) el crecimiento en agar CGB (Kwon-Chung *et al.*, 1982) (anexo 4).

A los aislamientos reconocidos como *Cryptococcus* mediante estas pruebas, se les practicó otras confirmatorias y de caracterización, así como determinación de la susceptibilidad in vitro.

#### IV.5.2. Identificación y caracterización molecular

**Extracción de ADN (Mihara *et al.*, 2012):** Se extrajo ADN a los aislamientos clínicos identificados previamente como *Cryptococcus* por los métodos descritos antes. Los mismos se sembraron en tubos de 16 x 120 mm con tapa de rosca con cuñas de ADSS hasta que el crecimiento cubrió la mitad de la superficie (aproximadamente una semana a 28 °C). Se utilizó el estuche comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Alemania) según la metodología descrita por el fabricante. El ADN se cuantificó por espectrofotometría (Jasco V-630, Japón) y se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

##### IV.5.2.1. Identificación del complejo *C. neoformans/C. gattii* mediante amplificación del fragmento *URA5* (Mihara *et al.*, 2012).

Todos los aislamientos previamente identificados como *Cryptococcus* fueron sometidos a la amplificación del fragmento *URA5*. Para esto se partió de 50 ng ADN molde, solución amortiguadora (10 mM Tris-HCl; pH 8,3, 50 mM KCl; y 50 ng de cada cebador: *ura5-f* y *ura5-r* (ver secuencia en anexo 5). Se utilizó el programa de amplificación: 1 ciclo a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 61 °C por 1 min y 72 °C durante 2 min, seguido por 1 ciclo de 72 °C por 10 min. Se utilizó como marcador molecular 100 bp *Ladder* (Invitrogen, EUA).

##### IV.5.2.2. PCR específica para la secuenciación de la región espaciadora de transcripción interna (*ITS1/5.8S/ITS2*) (Katsu *et al.*, 2004).

Este método se empleó para la identificación de los aislamientos para los cuales no se obtuvo amplificación de *URA5* y cuya identificación fue discordante por métodos convencionales. El ADN de los aislamientos, fue sometido a una PCR con los cebadores *ITS1* e *ITS4* (ver secuencia en anexo 5). Los productos amplificados fueron purificados mediante el empleo del estuche comercial *QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con posterioridad fueron empleados en reacciones de secuenciación nucleotídica. Para

dichas reacciones se utilizaron los mismos cebadores que en la PCR para obtener secuencias en ambos sentidos.

Se prepararon mezclas constituidas por 5 pmoles de cada uno de los cebadores especificados, 8  $\mu$ L de la mezcla de reacción de secuencia DTCS Quick Star Master Mix (suministrada con el *Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit*, (Beckman Coulter, EEUU), 5  $\mu$ L de ADN purificado (aproximadamente 100 ng) y 6  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para PCR, para completar 20  $\mu$ L de reacción. La reacción de secuencia constó de una desnaturalización por dos min a 96 °C, seguida de 50 ciclos con 20 s de desnaturalización a 96 °C, 20 s de hibridación a 50 °C y 4 min de extensión a 60 °C. Una vez concluida la reacción de secuencia se realizó la purificación del producto siguiendo el protocolo descrito en el estuche comercial *DTCS Quick Star Master Mix* (Beckman Coulter, EEUU).

La corrida de la reacción de secuencia se realizó en un secuenciador automático Beckman Coulter modelo CEQTM 8800 (EEUU) y se utilizó el procedimiento de análisis de datos crudos para productos de la PCR. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se introdujeron en un programa de alineamiento local básico (BLAST, de sus siglas en inglés) y se compararon con todas las secuencias disponibles en las bases de datos del sitio de internet <http://www.ncbi.nih.gov>. Finalmente se definió la especie correspondiente a cada aislamiento.

#### **IV.5.2.3. Determinación del tipo de apareamiento mediante PCR (Barreto de Oliveira *et al.*, 2004; Bovers *et al.* 2008)**

Se determinó la presencia de los alelos *MATa* y *MAT $\alpha$*  del locus *STE20* en los aislamientos identificados como *C. neoformans*. Se empleó 50 ng ADN molde; solución amortiguadora (10 mM Tris-HCl; pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 mM de dNTP; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U AmpliTaq ADN polimerasa y 50 ng de cada cebador: JOHE7270/JOHE7272 ( $\alpha$ A) y JOHE7264/JOHE7265 ( $\alpha$ A) (ver secuencia en anexo 5). El protocolo consistió en 5 min a 96 °C, seguido de 30 ciclos de 30 seg a

igual temperatura, 66 °C por 30 seg y un paso final de extensión a 72 °C por un minuto.

### **IV.5.2.4. Amplificación al azar de ADN polimórfico mediante reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR de sus siglas en inglés) con el cebador M13 (Meyer, 2003)**

La mezcla de reacción (50 µL) contuvo: MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L; dNTP 1,5 mmol/L; 10 µL de solución amortiguadora GoTaq® Flexi Green, GoTaq® Flexi ADN polimerasa (Promega) 2 U; cebador (ver secuencia en anexo 5) 100 pmol/L y 5 µL (10 ng/µL) de ADN molde. El programa de amplificación constó de 3 min a 94°C, seguido de un segundo paso de 40 ciclos (30 s a 94°C, 60 s a 50°C, 90 s a 72°C) y finalmente 5 min a 72°C.

Los patrones obtenidos fueron introducidos al programa BioNumerics. Se utilizó el coeficiente de similitud de Dice y el análisis de agrupamiento con el algoritmo UPGMA para la construcción del dendograma de similitud entre los aislamientos analizados.

**Visualización de los fragmentos amplificados:** En cada caso (amplificación de *URA5*, determinación del tipo de apareamiento y RAPD-PCR) el ADN amplificado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa con solución amortiguadora de tris-borato-EDTA (TBE) teñida con bromuro de etidio (0,5 mg/L) al 3%, 1,4% y 2% respectivamente. La corrida de los ácidos nucleicos, se ajustó a 60 V por 2 h y los resultados fueron foto- documentados (*FireReader* versión 15.08, UVIttek, Cambridge, UK) para su posterior análisis.

### IV.6. Determinación de la susceptibilidad a antifúngicos

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol y voriconazol mediante el método comercial ATB™ Fungus 3 (bioMérieux, Marcy, l'Étoile, Francia) siguiendo la metodología descrita por el fabricante la cual se describe brevemente en el anexo 6

La CMI se estimó mediante lectura visual al comparar el grado de crecimiento en cada una de las cúpulas en relación a las cúpulas controles. El resultado se expresó cuantitativamente según las siguientes definiciones:

- No reducción de crecimiento: 4
- Ligera reducción de crecimiento: 3
- Marcada reducción de crecimiento: 2
- Crecimiento muy débil: 1
- Ausencia de crecimiento: 0

La CMI de la anfotericina B, correspondió con la concentración más baja del antifúngico que permitió obtener una inhibición completa del crecimiento (codificación 0) y para los restantes antifúngicos con la concentración más baja con la cual se alcanzó codificación 2 ó menor. Para la clasificación de los aislamientos como sensible o resistente, se siguieron los valores de corte establecidos por [Espinel-Ingroff, et al., 2012a](#) y [Espinel-Ingroff, et al., 2012b](#) según se expresa en la siguiente tabla.

Valores de corte epidemiológicos del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* frente a la anfotericina B, 5-fluorocitosina, itraconazol, voriconazol y posaconazol mediante el empleo del método de microdilución en medio líquido según CLSI.

Antifúngico	μg/mL		
	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans/gattii</i>
Anfotericina B	0,5-1	0,5-1	0,5-1
5-fluorocitosina	8-16	4-16	4-16
Fuconazol	4	4-8	4-8
Itraconazol	0,12	0,12-0,5	0,12-0,5
Posaconazol	0,06-0,12	0,12	0,06-0,12
Voriconazol	0,03-0,06	0,06-0,12	0,03-0,12

#### IV.7. Recolección de los datos clínico – epidemiológicos de los pacientes con diagnóstico confirmado de infección por *C. neoformans/C. gattii*

Los datos se recogieron mediante la revisión de las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico confirmado de criptococosis por *C. neoformans/C.gattii*. Toda la información se compiló en una hoja de recogida de datos creada al efecto (anexo 7) para facilitar el análisis.

#### IV.8. Análisis estadístico

Para el procesamiento de la información se empleó el sistema operativo de Windows XP, se resumieron las variables de estudio mediante una base de datos creada al efecto. Se calcularon las frecuencias absolutas y porcentajes para

comparar los valores de susceptibilidad entre los aislamientos. En el anexo 8 se detalla la operacionalización de las variables estudiadas.

### **IV.9. Consideraciones éticas**

En este estudio se emplearon los aislamientos clínicos obtenidos durante el desempeño del laboratorio en las actividades de diagnóstico y referencia los cuales forman parte de la colección de cultivos de hongos del LM-IPK. Se garantizó la confidencialidad de los datos sobre los aislamientos y el anonimato de los pacientes. Los especímenes fueron procesados de forma numérica, nunca con el nombre del paciente y los datos personales obtenidos durante la investigación solo fueron utilizados por el investigador principal con fines científicos.

Los trabajos que conllevaron recolección de las muestras vegetales se realizó previo adiestramiento por personal experimentado tanto en esta actividad como en el procesamiento de las muestras. Se garantizó la conservación y protección de la flora y se evitaron daños o perjuicios al medio ambiente de acuerdo a lo establecido en el artículo 17 de la Declaración universal de las normas de bioética en su 4ta edición (2004).

Durante todo el trabajo experimental se cumplieron las buenas prácticas de laboratorio y todas las medidas de bioseguridad durante la manipulación de microorganismos según los niveles de riesgo establecidos por la lista oficial de agentes biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas de la Resolución No. 38/06 del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente.

El proyecto del cual se deriva este trabajo fue aprobado por los Comités Científico y de Ética de la Investigación del IPK (anexos 9 y 10)

# V. RESULTADOS

---

### V.1. Identificación convencional de las levaduras recuperadas a partir de muestras clínicas y ambientales

De los 25 aislamientos clínicos levaduriformes trabajados en el LM-IPK durante el período que comprendió este estudio, 16 (64%), mostraron características compatibles con *Cryptococcus* spp. tanto al examen macroscópico (colonias de 1 – 5 mm de diámetro, ligeramente convexas, de aspecto cremoso, lisas, brillantes, limitadas, de color blanco-crema y consistencia mucoide), microscópico (levaduras redondeadas u ovoides de 3,5 hasta 20  $\mu\text{m}$  de diámetro con célula hija generalmente única unida a la célula madre mediante un cuello estrecho y corto) así como los resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas (tabla 1).

De acuerdo a la selección inicial (crecimiento levaduriformes de aspecto cremoso, de color beige a marrón intenso en AAC), el 9% (18/200) de las fuentes ambientales muestreadas arrojaron una o más colonias con características compatibles con las del complejo *C. neoformans/C. gattii*. No obstante, de estas solo 5 (27,7%) fueron presuntivamente identificadas como *Cryptococcus* spp. mediante los métodos convencionales empleados (3 procedentes de almendros, 1 de mango y 1 de flamboyán); en tanto que el 72,3% restante correspondieron con otras especies de levaduras y bacterias (tabla 2).

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas empleadas para la identificación de la especie de los aislamientos estudiados mediante pruebas convencionales. Los resultados fueron interpretados según de Hoog y cols, 2009.

Aislamientos	Asimilación de hidratos de carbono															Crecimiento 37 °C	FO	CGB	Identificación
	Glu	Gal	Sac	Mal	Cel	Tre	Lac	Mel	Raf	Mez	Xil	Ara	Eri	MDG	Ino				
1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>C. gattii</i>
6	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
7	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
9	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
12	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
13	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
22	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
25	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	¿	¿	+	+	-	<i>C. albidus</i>
31	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
32	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
33	+	+	+	+	+	+	-	-	¿	+	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
34	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
35	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>
36	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>C. neoformans</i>

Glu = glucosa; Gal = galactosa; Sac = sacarosa; Mal = maltosa; Cel = celobiosa; Tre = trehalosa; Lac = lactosa; Mel = melibiosa; Raf = rafinosa; Mez = melezitosa; Xil = xilosa; Ara = arabinosa; Eri = eritritol; MDG = ; Ino = inositol; FO = fenoloxidasas; CGB = L-canavanina-glicina-azul bromotimol

Tabla 2. Resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas empleadas en la identificación de género de los aislamientos de origen ambiental estudiados mediante pruebas convencionales.

Aislamientos ambientales	Crecimiento a 37 °C	Pigmentación en AAC	Asimilación de inositol	Hidrólisis de la urea	Filamentación en AHM+T <sub>80</sub>
1	+	+	-	+	+
2	+	+	-	+	+
3	+	+	-	+	-
4	+	+	-	+	-
5	+	+	-	+	-
6	+	+	-	+	-
7	+	+	-	+	-
8	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	-
11	+	+	-	+	-
12	+	+	-	+	+
13	+	+	-	+	+
14	+	+	-	+	+
15	+	+	-	+	+
16	+	+	+	+	-
17	+	+	-	+	+
18	+	+	+	+	-

AAC = agar ácido cafeico; AHM+T80 = agar harina de maíz con tween 80

## V.2. Identificación molecular

La cantidad de ADN obtenido en cada caso arrojó concentraciones entre 23,4 µg/mL y 88,8 µg/mL (media 38,5 µg/mL). Por su parte, la evaluación electroforética demostró integridad del material genético y baja contaminación con proteínas y ARN (datos no mostrados).

Amplificación del gen *URA5*: Esta herramienta demostró la presencia de una banda de 800 pb en 13 de los 21 aislamientos estudiados (figura 1). La misma no pudo ser detectada en ninguno de los especímenes recuperados a partir de muestras ambientales (datos no mostrados) ni en los aislamientos 25, 33 y 34 procedentes de muestras clínicas. Estos últimos fueron sometidos a secuenciación nucleotídica del fragmento *ITS1-5,8S-ITS2* del ARNr en tanto los restantes se descartaron.

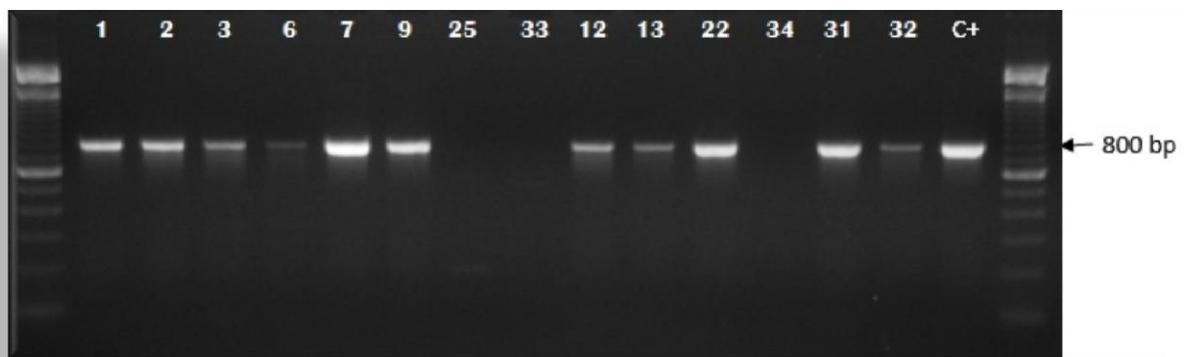


Figura 1. Visualización mediante corrida electroforética de los fragmentos amplificados del gen *URA5*.

Secuenciación del fragmento *ITS1-5,8S-ITS2* del ARNr: Los aislamientos N° 25 y 33, presuntamente identificados como *C. albidus* y *C. neoformans* respectivamente mediante los métodos convencionales, presentaron una identidad del 100% (321/321) con *Candida haemulonii* (número de acceso JX459689.1). Por su parte el aislamiento N° 34 previamente identificado como *C. neoformans*, pero para el cuál no se obtuvo amplificación de *URA5*, tuvo un 99% (501/503) de identidad con *C. neoformans* var. *grubii* (número de acceso CP003821.1). Finalmente, la secuenciación del aislamiento N° 3 corroboró la identidad del mismo como *C. gattii* (100% de similitud con el aislamiento de esta especie inscrito bajo el número de acceso KC424622–KC424635 del Genbank). En la tabla 3 se muestra la comparación de los resultados obtenidos entre los métodos de identificación empelados.

Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos mediante la identificación por los métodos convencionales y moleculares.

Aislamiento N°	Origen del aislamiento	Convencional	Amplificación URA5	Secuenciación ITS1-5,8S-ITS2	Identificación final
1	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
2	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
3	clínico	<i>C. gattii</i>	+	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>
6	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
7	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
9	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
12	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
13	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
22	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
25	clínico	<b><i>C. albidus</i></b>	-	<b><i>Candida haemulonii</i></b>	<i>Candida haemulonii</i>
31	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
32	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
33	clínico	<b><i>C. neoformans</i></b>	-	<b><i>Candida haemulonii</i></b>	<i>Candida haemulonii</i>
34	clínico	<i>C. neoformans</i>	-	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
35	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
36	clínico	<i>C. neoformans</i>	+	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
	Ambiental	<b><i>Cryptococcus</i> sp.</b>	-	NR	<i>no Cryptococcus</i>
	Ambiental	<b><i>Cryptococcus</i> sp.</b>	-	NR	<i>no Cryptococcus</i>
	Ambiental	<b><i>Cryptococcus</i> sp.</b>	-	NR	<i>no Cryptococcus</i>
	Ambiental	<b><i>Cryptococcus</i> sp.</b>	-	NR	<i>no Cryptococcus</i>
	Ambiental	<b><i>Cryptococcus</i> sp.</b>	-	NR	<i>no Cryptococcus</i>

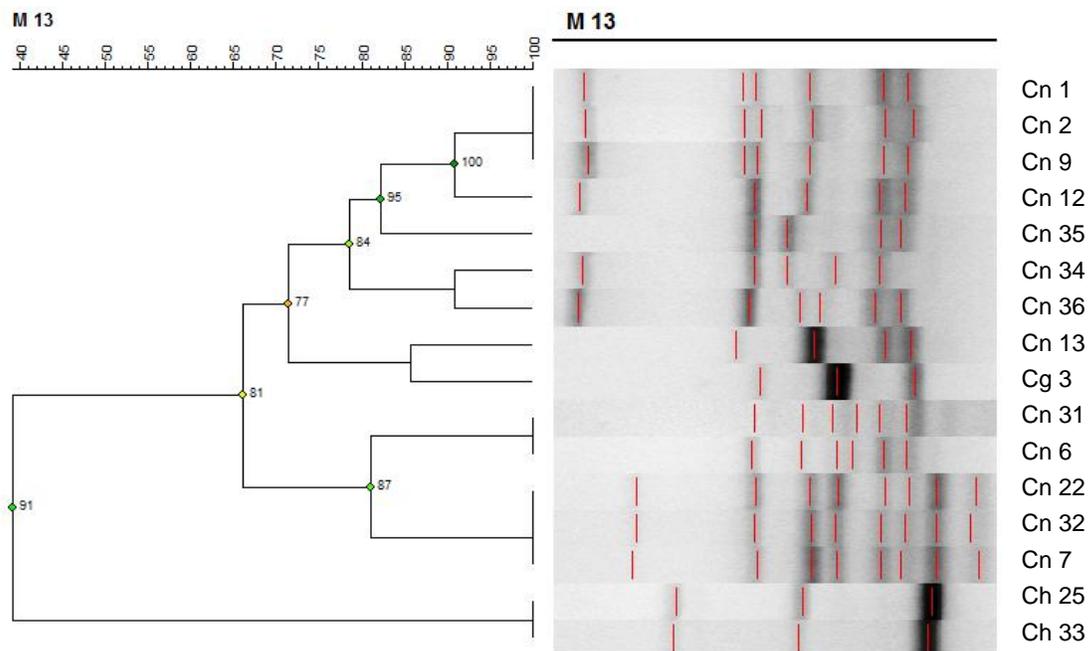
**Nota:** Se destacan los resultados discordantes entre el método convencional y el molecular.

NR: No realizada

### V.3. Caracterización molecular

Serotipo y tipo de apareamiento: Los estudios moleculares que se realizaron en este trabajo para determinar el serotipo y tipo de apareamiento de los 13 aislamientos identificados previamente como *C. neoformans*, demostraron que todos pertenecen al serotipo A (var. *grubii*) y son portadores del alelo *MAT $\alpha$* .

Caracterización con M13-PCR: La figura 2 muestra los patrones genéticos y el dendograma de similitud resultante del análisis de los aislamientos mediante esta herramienta molecular. La misma permitió reconocer nueve patrones diferentes entre los especímenes del complejo *C. neoformans/C. gattii* estudiados, los cuales incluyeron seis aislamientos con patrones únicos (aislamientos N° 3, 12, 13, 34, 35 y 36) y 3 agrupaciones con patrones diferentes: patrón I (aislamientos N° 7, 22 y 32); patrón II (aislamientos N° 1, 2 y 9) y patrón III (aislamientos N° 6 y 31). Adicionalmente, los aislamientos identificados como *C. haemulonii* mostraron huellas genéticas similares, por lo que conformaron también una agrupación.



Cn = *Cryptococcus neoformans*; Cg = *Cryptococcus gattii*; Ch = *Candida haemulonii*

Figura 2. Resultados obtenidos mediante la caracterización con M13-PCR. A la derecha los patrones moleculares obtenidos y a la izquierda el dendograma de similitud entre los aislamientos analizados con el empleo del programa informático BioNumerics.

#### V.4. Evaluación de la susceptibilidad para los aislamientos previamente identificados como *C. neoformans*/*C. gattii*

Los resultados de susceptibilidad frente al panel de antifúngicos contenidos en la galería del método comercial ATB Fungus 3 se representan en la tabla 4. La misma muestra que el valor de CMI coincidió con la menor concentración de cada droga en cuestión utilizada en el sistema frente a todos aislamientos estudiados.

Tabla 4. Comportamiento de la susceptibilidad de los 14 aislamientos de *C. neoformans*/*C. gattii* estudiados frente a los antifúngicos contenidos en la galería del método comercial ATB Fungus 3.

CMI (µg/mL)	5FC	Flu	AnfB	Itr	Vor
0,06					13
0,12				13	13
0,5			13	13	13
1		13	13	13	13
2		13	13	13	13
4	13	13	13	13	13
8	13	13	13		13
16	13	13	13		
32		13			
64		13			
128		13			

5FC = 5-fluorocitosina; Flu = fluconazol; AnfB = anfoetricina B; Itr = Itraconazol; Vor = voriconazol

#### V.5. Datos clínico-epidemiológicos recogidos de las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico confirmado de criptococosis por *C. neoformans*/*C. gattii*.

A partir de la revisión de la historia clínica de los pacientes con diagnóstico de criptococosis confirmado microbiológicamente se constataron los datos expresados

en la tabla 5. Además, se evidenció la presencia de infecciones concomitantes de origen bacteriano, micótico, viral y parasitario en los pacientes con sida (figura 3).

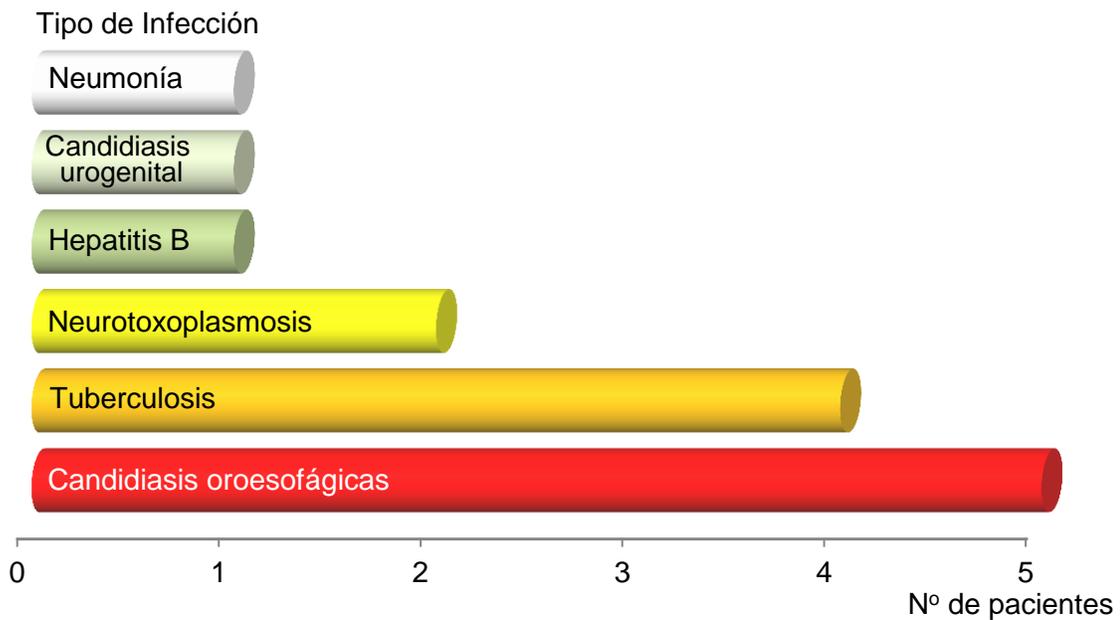
**Tabla 5.** Análisis porcentual de los resultados obtenidos mediante el examen directo con nigrosina y el cultivo en ADSS de las muestras de LCR recibidas en el LM-IPK.

Método	Pacientes con sida		Pacientes sin sida	
	n = 10	%	n = 4*	%
Examen directo	9	90	2	66,6
Cultivo	10	100	3	100

Fuente: Historia clínica de los pacientes.

Los porcentajes fueron calculados en base al número total de pacientes con y sin sida respectivamente

\*En uno de los casos no se pudo recoger los datos de la historia clínica



Fuente: Historia clínica de los pacientes

Figura 3. Infecciones referidas en las historias clínicas de los pacientes con sida en el momento del diagnóstico de criptococosis o durante la evolución de la misma.

---

La media de la edad fue 35,2 años para los pacientes con sida y 46,6 años en los seronegativos al VIH. En ambos grupos predominó el sexo masculino (2,3:1 y 3:1 respectivamente). El 53,8% de los pacientes procedían de La Habana, en tanto que los restantes pertenecían a provincias centro-orientales (tabla 6).

De manera general, el principal factor predisponente para el desarrollo de criptococosis fue la infección por el VIH (71,4%). Entre los individuos seronegativos a este virus, se constató el antecedente de tratamiento con esteroides (paciente con psoriasis) y de trasplante renal. En dos de los pacientes no se referenció ninguna enfermedad de base (tabla 6).

En ningún caso las historias clínicas reflejaron antecedentes de contacto directo o indirecto con palomas o sus excretas. Como datos epidemiológicos de interés se registró la visita del paciente N° 3 a Honduras (2003-2005) y Guatemala (2007-2009) donde trabajó como médico general y la procedencia de Angola del paciente N° 8 (tabla 6).

Al menos el 50% de los pacientes con VIH presentaron como manifestaciones clínicas más frecuentes al ingreso cefalea, fiebre y focalización neurológica. Por su parte, en los pacientes VIH negativos predominaron estos últimos además de los signos meníngeos y las alteraciones de conciencia (tabla 6).

En 11 de los pacientes se utilizó como terapia de primera línea la anfotericina B (0,5-1 mg/kg/d) al menos durante 2 semanas. La misma se asoció al fluconazol (6 – 12 mg/kg/d) en 10 de los casos estudiados. Esta última droga fue utilizada también como terapia de mantenimiento en los pacientes con sida. Solo en dos de los casos se utilizó la monoterapia con anfotericina B y fluconazol de manera independiente con dosis iguales a las referidas anteriormente. En el caso del paciente N° 3 se aplicaron también otras alternativas terapéuticas de más reciente generación: anfotericina B liposomal (3 mg/kg), voriconazol (800 – 600 mg/d), intacglobin (50 y 400 mg/kg de peso corporal una vez al día durante 5 días consecutivos) e IFN $\gamma$

**Tabla 6.** Datos clínico-epidemiológicos extraídos de las historias clínicas de los pacientes con sospecha de meningoencefalitis por *C. neoformans/gattii*

Datos	Paciente														
	1	2	3	6	7	9	12*	13	22	31	32	34*	35	36	
Generales	Edad (años)	26	21	56	48	56	27	69	47	27	33	25	aislamient	30	37
	Sexo	F	M	M	F	M	M	M	M	M	F	F	M	M	M
	Provincia	Hab	Hab	VC	Hab	Hab	Stgo	Hab	Angola	Hab	Hab	Cam	Cam	Hab	Mtz
	Antecedentes	VIH	VIH	-	VIH	VIH	VIH	Psoriasis	VIH	VIH	VIH	-	Trasplante	VIH	VIH
Principales síntomas y signos	Síntomas generales	x	x	-	-	-	-	-	-	x	x	x	-	-	-
	Cefalea	-	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x
	Fiebre	x	x	x	x	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
	Fotofobia	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Náuseas y vómitos	x	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	-	x	-
	Alteraciones de conciencia	-	-	x	-	x	x	x	-	-	x	x	-	x	-
	Signos meníngeos	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	x	-	x	-
Focalización neurológica	-	x	x	x	x	x	x	-	x	-	x	-	x	-	
Evolución	Favorable	x	-	-	x	x	-	-	x	x	x	-	-	x	
	Tórpida	-	x	x	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	
	Fatal	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	
Tratamiento	Ataque	Flu	AnfB/ Flu	AnfB / Flu	AnfB / Flu	AnfB / Flu	AnfB / Flu	-	AnfB / Flu	AnfB / Flu	AnfB / Flu	AnfB / Flu	-	AnfB / Flu	AnfB
	Mantenimiento	Flu	-	AnfB L Flu/ Vor	Flu	Flu	Flu	-	Flu	-	Flu	-	-	-	-

Hab = La Habana; VC = Villa Clara; Stgo = Santiago de Cuba; Cam = Camagüey; Mzt = Matanzas.

Síntomas generales: malestar general, decaimiento, pérdida de peso; Signos meníngeos: rigidez de nuca, vómitos en proyectil

Flu = fluconazol; AnfB = anfotericina B; AnfBL = anfotericina B liposomal; Vor = voriconazol

\* = No se obtuvo acceso a la historia clínica del paciente. Los datos contenidos en la tabla se encontraban referidos en sendas órdenes de análisis.

recombinante (200 mg subcutáneo tres veces por semana durante dos meses). El 21,4% de los pacientes presentaron cuadros de recurrencias y hasta la fecha han fallecido cuatro de ellos (28,5%) (tabla 6)

A todos los pacientes se les indicó hemograma con diferencial y eritrosedimentación (VSG). En 10 pacientes (71,4%) las principales alteraciones encontradas fueron la anemia y la VSG acelerada. En nueve de los diez pacientes con sida se constató leucopenia, no así en los seronegativos al VIH.

Se analizó como complementario de mayor interés el estudio del LCR. El análisis evolutivo tuvo tendencia a la normalización en siete pacientes, con excepción de los que presentaron fracaso terapéutico (tabla 7).

Tabla 7. Estudio citoquímico del LCR en pacientes con criptococosis meníngea en el momento de diagnóstico de la enfermedad.

Parámetros	Pacientes con sida (n=10)		Pacientes sin sida (n=4)*	
	N	%	N	%
Proteínas > 0,45 g/L	10	100	3	75
Glucosa < 2,0 mmol/L	3	30	0	0
Células > 5 cel/mm <sup>3</sup>	9	90	2	50
Pandy positivo	7	70	2	50

Fuente: Historia clínica de los pacientes.

\*En dos de los casos no se pudo recoger los datos de la historia clínica

Se corroboró que la mayoría de los individuos coinfectados con VIH presentaban conteos de TCD4+ por debajo de los límites normales (tabla 8).

Tabla 8. Conteo de células TCD4<sup>+</sup> en pacientes con criptococosis meningea.

Valores de CD4 <sup>+</sup>	Pacientes con sida (n=10)		Pacientes sin sida (n=4)*	
	N	%	N	%
< 200 cel/mm <sup>3</sup>	9	90	0	0
200- 500 cel/mm <sup>3</sup>	1	10	0	0
> 500 cel/mm <sup>3</sup>		0	2	50

Fuente: Historia clínica de los pacientes.

\*En 2 de los casos no se pudo recoger los datos de la historia clínica

# VI. DISCUSIÓN

---

En las últimas décadas, la incidencia de la criptococosis y su repercusión como problema en la salud pública se incrementó considerablemente a nivel mundial. Son múltiples los factores que favorecieron este incremento, pero ninguno de ellos tuvo un impacto tan profundo como el de la epidemia del sida que comenzó a inicios de la década de 1980 (Vidal *et al.*, 2013). La introducción de la TARVAE, modificó sustancialmente la historia natural de la infección por el VIH e incidió positivamente en la disminución en hasta un 50% el riesgo de contraer criptococosis en este grupo de pacientes (Park *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2013). No obstante, esta micosis es considerada en Cuba como la tercera en orden de frecuencia entre las infecciones de origen fúngico en estos individuos (Arteaga *et al.*, 1998). Los estudios realizados anteriormente en este país, demostraron un franco predominio de la especie *C. neoformans* ser. A tanto en muestras clínicas como ambientales (Illnait-Zaragozí *et al.*, 2010b). Los resultados expuestos en esta tesis permiten profundizar en los conocimientos y experiencias ya adquiridas a cerca de la criptococosis y su agente causal a partir del estudio de los aislamientos de *Cryptococcus* spp. obtenidos de muestras ambientales y clínicas en el LM-IPK.

#### **Aislamiento e identificación de levaduras del género *Cryptococcus* a partir de muestras ambientales mediante técnicas convencionales.**

*Eucalyptus camaldulensis* es la especie de árbol más asociada a aislamientos de *C. gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 2011). Esto posiblemente se debe a que desde que Ellis y Pfeiffer reportaron por primera vez la recuperación de esta levadura a partir de los mismos, estos han sido uno de los más estudiados. Posteriormente se logró demostrar su presencia en un espectro más amplio de especies de eucaliptos (*E. tereticornis*, *E. microcorys*, *E. grandis*, *E. rudis*, *E. gomphocephala*, *E. blakelyi*, *E. citriodora*) (Cabral, 1999). Más adelante los trabajos realizados en especial por Randhawa y sus colaboradores así como otros autores, demostraron un rango aún más amplio de hospedadores al describir la asociación del complejo *C. neoformans/C. gattii* con *Syzygium cumini*, *Butea monosperma*, *Polyalthia*

---

*longifolia*, *Mimusops elengi*, *Azadirachta indica*, *Manilkara hexandra*, *Acacia nilotica*, *Cassia fistula*, *Cassia grandis*, *Ficus microcarpa*, *Ficus religiosa*, *Mangifera indica*, *Senna multijuga* y *Terminalia cattapa* entre otras fuentes vegetales (Randhawa *et al.*, 2005; Hiremath *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Hagen y Boekhout, 2010). Dados estos antecedentes, en el presente trabajo se incluyeron todos los ejemplares adultos de plantas con cavidades o ranuras profundas en el tronco que se encontraban en áreas públicas de las localidades seleccionadas.

La mayoría de las investigaciones sobre la prevalencia de este microorganismo a partir de fuentes ambientales a nivel mundial, se realizaron fundamentalmente en las capitales de países y ciudades con gran densidad de población. Ejemplo de esto, son los resultados publicados por Montenegro y Paula (2000) quienes demuestran que ambas especies del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* se encuentran en mayor proporción en ambientes urbanos de São Paulo. En un estudio similar Hamasha, corrobora estos resultados al aislar *C. neoformans* var. *neoformans* de cuatro ciudades importantes de Jordán (Hamasha *et al.*, 2004). Otros autores incluyeron en sus trabajos jardines zoológicos, parques y bosques en busca de mayor número y diversidad de ejemplares de árboles (Randhawa *et al.*, 2005). En el presente trabajo nos propusimos realizar el estudio en La Habana, provincia de mayor densidad de población de Cuba (más de dos millones de habitantes) y se seleccionaron para el muestreo los municipios Playa y La Lisa por su cercanía al IPK así como por poseer abundante y variada vegetación.

Randhawa y cols. sugirieron que para la colecta de muestras a partir de estas fuentes, el hisopado es más eficaz que la recogida de los detritos vegetales propiamente dichos (Randhawa *et al.*, 2005). Este último es un proceso laborioso; sin embargo, la experiencia de estudios previos realizados en el LM-IPK mediante hisopados no rindió los frutos esperados (Illnait-Zaragozí *et al.*, 2012) por lo que en el presente trabajo se decidió emplear el método tradicional por considerar además, que este pudiera ser más representativo al permitir examinar un mayor volumen de cada muestra.

Las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* son capaces de sintetizar polisacáridos complejos, melanina, manitol, esteroides y otros compuestos. Aunque estas características se relacionan con su capacidad de producir infección en el humano, su función básica es lograr la adaptación y sobrevivencia en el ambiente. Estos atributos se emplean ampliamente en la diferenciación de estas especies (Casadevall y Perfect, 1998). Así por ejemplo, la capacidad para sintetizar pigmento (melanina) a partir de compuestos difenólicos es una característica que se debe a la presencia de la enzima fenoloxidasasa la cual se considera uno de sus marcadores fenotípicos más importantes. No obstante, los resultados del presente trabajo en cuanto a la identificación de los aislamientos ambientales, coinciden con los publicados con anterioridad, donde se demuestra que otras especies de *Cryptococcus* diferentes del complejo *C. neoformans/C. gattii* y *Trichosporon cutaneum* también pueden producir pigmentación (Fonseca et al., 2011). Esto hace necesario la confirmación por otros métodos para reducir los errores en la identificación (Kwon-Chung et al., 2011), afirmación que queda en evidencia una vez más en el presente estudio, en el que los cinco aislamientos presuntivamente identificados como *C. neoformans/C. gattii* mediante técnicas convencionales fueron impugnados por las moleculares.

#### **Aislamiento e identificación de levaduras del género *Cryptococcus* a partir de muestras clínicas de pacientes con sospecha de criptococosis mediante técnicas convencionales.**

El diagnóstico de la criptococosis constituye aún un reto difícil debido a la escasa especificidad de los síntomas y signos, así como la ausencia de hallazgos radiológicos patognomónicos (Quindós et al., 2012). Esto hace que hasta el momento la confirmación se base en el aislamiento e identificación del agente causal. Los medios más utilizados para el cultivo de *Cryptococcus* spp. es el agar dextrosa de Sabouraud con y sin cloranfenicol (anexo 2), ya que estos medios

---

permiten su recuperación a partir de muestras clínicas y la descripción de las características de la colonia (Rezusta *et al.*, 2001).

Según la metodología convencional empleada en este estudio, el 87,5% de los 16 aislamientos clínicos identificados como *Cryptococcus* spp. correspondieron con la especie *C. neoformans*. Este resultado corrobora una vez más lo reportado en la literatura donde este agente es reconocido como el principal responsable de los cuadros de criptococosis tanto en humanos como en animales de forma universal y el más frecuentemente encontrado durante la búsqueda de posibles fuentes de infección en el ambiente (Fonseca *et al.*, 2011; Lazera *et al.*, 2000).

En el presente estudio, uno de los aislamientos fue identificado como *C. gattii*. Este constituye el segundo en frecuencia como causa de criptococosis de forma general y el primero entre individuos seronegativos al VIH (Chowdary *et al.*, 2012; Chowdary *et al.*, 2013). En Cuba constituye el primero obtenido a partir de muestra clínica humana. La experiencia anterior en este país se limita a su recuperación de la secreción nasal de un guepardo importado desde Sudáfrica al Zoológico Nacional; no obstante, los estudios realizados, apuntan hacia la posibilidad de que el animal arribara a la instalación con una infección latente adquirida en el lugar de procedencia (Polo *et al.*, 2010; Illnait-Zaragozí *et al.*, 2011). Hasta la fecha no se ha logrado demostrar la presencia de este agente en los estudios realizados a partir de muestras ambientales cubanas (Illnait-Zaragozí *et al.*, 2010a; Illnait-Zaragozí *et al.*, 2012). Sin embargo, resulta válido continuar insistiendo al respecto debido a su repercusión clínica de y la presencia de condiciones medioambientales favorables para su subsistencia en esta isla.

El otro aislamiento identificado por los métodos convencionales perteneciente al género *Cryptococcus* resultó *C. albidus*. Aunque la criptococosis es virtualmente producida por las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii*, la literatura relata un número cada vez mayor de reportes de casos por *C. albidus*, los cuales son responsables de aproximadamente el 80% de las infecciones causadas por otras

especies diferentes de este complejo (Khawcharoenporn *et al.*, 2007). La identificación correcta de estos agentes tiene gran relevancia clínica, ya muestran diferente susceptibilidad a los antifúngicos, lo que conlleva cambios en la conducta terapéutica (Pfaller *et al.*, 2009).

Los resultados de la identificación mediante métodos convencionales de los aislamientos clínicos incluidos en este trabajo coincidieron con lo reportado en la literatura internacional independientemente del período de estudio y el país de procedencia como se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9.** Porcentaje de aislamiento de las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* en pacientes con sida según algunos de los reportes encontrados en la literatura.

País	No. total de muestras analizadas	<i>C. neoformans</i> (%)	<i>C. gattii</i> (%)	Referencia
Iberoamérica*	177	96,8	3,2	Meyer <i>et al.</i> , 2003
Tailandia	183	100	0	Simwami <i>et al.</i> , 2011
Canadá	113	76,1	23,9	McTaggart <i>et al.</i> , 2011
Argentina	32	100	0	Córdoba <i>et al.</i> , 2011
Brasil	50	94	6	Fernandes <i>et al.</i> , 2000

\*Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México, Perú, Venezuela, Guatemala y España

Los resultados obtenidos anteriormente en el LM-IPK a partir de muestras clínicas obtenidas de adultos y niños evidenció en el 100% de los pacientes la presencia de *C. neoformans* var. *grubii* como agente causal de la infección (Torres, 2002; Illnait-Zaragozı́ *et al.*, 2013).

La obtención de cultivos puros permite la identificación del agente aislado, así como su caracterización desde diversos puntos de vista (susceptibilidad, patogenicidad, huellas genéticas, etc) (Quindós *et al.*, 2012). Entre los inconvenientes que presenta la identificación convencional se encuentra la existencia de microorganismos con comportamientos fisiológicos y bioquímicos atípicos lo cual da al traste con la

---

correcta identificación de los mismos (Ruane *et al.*, 1988; Polacheck y Kown-Chung, 1996; Ikeda *et al.*, 2002; Tay *et al.*, 2008). No obstante, la principal limitación de estas técnicas está dada por el tiempo requerido para obtener resultados, lo cual retrasa el diagnóstico y el tratamiento del paciente, así como requerir de personal avezado capaz de interpretar correctamente dichos resultados. Esto condicionó el desarrollo de nuevos métodos con vistas a superar dichas dificultades (Quindós *et al.*, 2012).

Dadas las limitaciones ya mencionadas, se determinó llevar a cabo la identificación molecular de las levaduras con vistas a dar solución estas incongruencias.

#### **Identificación y caracterización de levaduras aisladas del género *Cryptococcus* mediante técnicas moleculares**

Según la disponibilidad en el LM-IPK, en primera instancia se empleó la amplificación del gen *URA5* como método de identificación de *C. neoformans/C. gattii*. Este fragmento de gen es uno de los más utilizados con este objetivo, pues presenta alta especificidad para este complejo de especies (Boekhout *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2003; Kidd *et al.*, 2007). Este método permitió confirmar los resultados de los métodos convencionales en el 81,25% del total de 16 aislamientos estudiados, en tanto que el 18,75% no mostró evidencias de amplificación. En el caso del espécimen N° 25, era un resultado esperado ya que el mismo fue previamente identificado de forma convencional como *C. albidus*. Sin embargo, los aislamientos N° 33 y 34, presuntamente identificados como *C. neoformans* resultaron negativos durante la amplificación de *URA5*. Esto pudiera deberse a múltiples causas: i) dependientes de la calidad del material genético empleado, lo cual fue descartado ya que el mismo resultó óptimo según la caracterización realizada (concentración y pureza) y por rendir buenos resultados en pruebas moleculares posteriores (Ej. secuenciación de la región *ITS1-5.8S-ITS2* del ARNr y PCR fingerprinting con el cebador M13); ii) dependientes de errores durante el desarrollo de la técnica,

---

igualmente rechazado teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los restantes aislamientos y los controles empleados durante la misma y iii) dependientes del microorganismo, ya que estos pueden sufrir mutaciones aún en regiones conservadas lo que ocasiona alteraciones en las secuencias diana e interferencia en el reconocimiento por los cebadores. Este último se valoró como el factor más probable ante la ausencia de otros elementos y la posibilidad de los resultados “falsos negativos” en el caso de los aislamientos presuntamente identificados como *C. neoformans*/*C. gattii*.

Como método confirmatorio de identificación para los aislamientos presumiblemente identificados como *C. albidus*, *C. gattii* y *C. neoformans* para los cuales no se obtuvo amplificación del fragmento *URA5*, se procedió con la secuenciación de la región *ITS1-5.8S-ITS2* del ARNr en cada caso. Este procedimiento a pesar de que fue descrito desde los años '70 del siglo pasado, no se aplicó a los estudios del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* hasta mediados de la década de 1990, lo que dió una nueva perspectiva en torno a la identificación, los análisis de microevolución, virulencia y epidemiología. Aunque es más laborioso y costoso, la secuenciación del material genético es actualmente un procedimiento común en la mayoría de los laboratorios clínicos donde los recursos financieros lo permiten ya que tiene un mayor poder discriminatorio que el proporcionado por medios diferenciales y pruebas bioquímicas (Pryce *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010).

En los laboratorios donde la secuenciación nucleotídica está disponible, habitualmente este análisis representa el método óptimo para la identificación de microorganismos, incluyendo las especies del género *Cryptococcus*. La región ITS (incluido el fragmento 5.8S del ARNr) es la región más empleada en la identificación molecular de agentes fúngicos debido a su alto grado de variabilidad (Hsu *et al.*, 2003; Katsu *et al.*, 2004).

Este método permitió corroborar como *C. gattii* al aislamiento identificado como tal de forma convencional. Sin embargo, aquellos presumiblemente identificados como

---

*C. albidus* y *C. neoformans* para los cuales no se obtuvo amplificación del gen *URA5*, correspondieron con *Candida haemulonii*. En la literatura disponible, solo encontramos seis reportes esta especie como causa de infección; las mismas estuvieron asociadas a bacteriemia en pacientes con estadías hospitalarias prolongadas y nutrición parenteral (Nobrega de Almeida *et al.*, 2012; Rodero *et al.*, 2002; Giusiano G *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Ruan *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2007). Esta constituye pues, la primera evidencia de infección por este agente en Cuba y posiblemente a nivel mundial como causa de meningitis. Finalmente se corroboró la identificación del aislamiento N° 34, presuntamente reconocido como *C. neoformans* por el método convencional pero para el cual no se obtuvo amplificación *URA5*, aspecto que fue discutido anteriormente.

Los métodos moleculares presentan alta complejidad, son más costosos y requieren de personal adiestrado para su ejecución; no obstante, su elevada sensibilidad y especificidad lo hacen elegible como método de elección para confirmar la identificación ante la obtención de resultados inesperados o cuando existe discordancia entre los métodos empleados (McTaggart *et al.*, 2011; Champa *et al.*, 2009).

### **Caracterización de los aislamientos mediante técnicas moleculares**

El PCR fingerprinting con el cebador *M13* se fundamenta en la detección de secuencias de ADN repetitivo hipervariables y se considera como una de las más rápidas para la detección de patrones de bandas. El hecho de utilizar un cebador de este tipo elimina la necesidad de conocer previamente la secuencia genética a estudiar y proporciona una mayor capacidad de discriminación en comparación con los análisis bioquímicos y serológicos. Con este propósito, además del *M13* también se emplean otras secuencias dianas tales como *URA5*, *CNLAC1*, *CAP59*, *CAP64*, *PBL1* y *GACA4* (Meyer *et al.*, 2003; Kidd *et al.*, 2007).

---

Una vez determinado el protocolo de extracción de ADN más conveniente y las condiciones óptimas de reacción de PCR se llevó a cabo el análisis de los aislamientos mediante el *M13*-PCR. Este generó nueve perfiles genéticos que incluyeron seis aislamientos con patrones únicos y tres agrupaciones conformadas por dos a tres aislamientos cada una. Esta técnica no permitió arribar a conclusiones sobre la identificación debido a la carencia de material genético que se recomienda como referencia en la identificación de los patrones correspondientes a los diferentes tipos genéticos. No obstante, sus resultados sugieren relativa variabilidad genética entre los aislamientos clínicos cubanos, tal como se demostró anteriormente mediante otras técnicas de mayor resolución como el AFLP y el STR (Illnait-Zaragozí *et al.*, 2010a). La caracterización mediante *M13*-PCR es ampliamente empleada en la determinación de huellas genéticas de diversos microorganismos. En el caso del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, uno de los estudios más recientes realizado en México, fue capaz de demostrar la presencia de todos los genotipos previamente reportados y la amplia distribución geográfica de estos (Castañón *et al.*, 2009).

Todos los aislamientos molecularmente corroborados como *C. neoformans* correspondieron con el serotipo A, tipo de apareamiento  $\alpha$ . Estos resultados confirman los anteriormente encontrados en Cuba (Fernández *et al.*, 1998; Illnait-Zaragozí *et al.*, 2010a) y en el mundo (Lin *et al.*, 2008). La posibilidad de poder determinar estas características resulta de gran utilidad para la mejor comprensión sobre la ecología, la epidemiología, la patogenia de *C. neoformans* y la clínica de la infección que ocasiona.

Los alelos *MAT $\alpha$*  y *MAT $\alpha$*  son segregados en igual proporción durante el entrecruzamiento genético (Metin *et al.*, 2010). Sin embargo, reportes previos muestran que *MAT $\alpha$*  está presente en los aislamientos clínicos y ambientales en una proporción muy superior al *MAT $\alpha$*  (30:1). Este hecho sugiere que *MAT $\alpha$*  presenta ciertas ventajas selectivas para la supervivencia (Hiremath *et al.*, 2008) y se comprobó mediante infección experimental que resulta más virulento al ocasionar

---

infección diseminada al sistema nervioso central con mayor frecuencia en relación a MATa (Litvintseva *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2008).

### **Susceptibilidad in vitro de los aislamientos del complejo *C. neoformans/C. gattii***

La determinación de la susceptibilidad in vitro, resulta de gran utilidad como soporte a los estudios de eficacia clínica de los antimicrobianos, para determinar resistencia tanto intrínseca como adquirida de los microorganismos y desde el punto de vista práctico para definir el espectro de actividad de las drogas disponibles (Arikan, 2007; Johnson *et al.*, 2008).

El método de dilución en medio líquido fue el primero en ser optimizado y estandarizado para el estudio de la susceptibilidad de levaduras. Este fue desarrollado por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS, de sus siglas en inglés), hoy Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, de sus siglas en inglés). Posteriormente, este método se adaptó al formato de placas de microdilución, el cual es el más aceptado como referencia en la actualidad (Johnson *et al.*, 2008; CLSI, 2008). Debido a su complejidad, al elevado consumo de tiempo y a que en ocasiones su interpretación resulta difícil, se desarrollaron otros métodos con vistas a superar estas desventajas. Hoy existen en el mercado diferentes pruebas para la determinación de la susceptibilidad a los antifúngicos en diferentes formatos. Una de las que ha logrado mayor aproximación a la metodología de referencia, es el ATB Fungus (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia), el cual cuenta con los antimicóticos de elección en el tratamiento de la criptococosis y otros de más reciente generación los cuales son empleados como alternativos (Johnson *et al.*, 2008).

Los resultados de la actividad antifúngica in vitro mediante el sistema comercial empleado, mostraron patrones uniformes de susceptibilidad entre los aislamientos frente a todos los antimicóticos. La 5-fluorocitosina generó los valores más altos de CMI

---

seguido por el fluconazol, la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol en orden decreciente.

Desafortunadamente, el CLSI solo ha publicado hasta la fecha los valores de corte para la 5-fluorocitosina y algunos azoles frente a *Candida* spp. (CLSI, 2008). No obstante, los trabajos de Espinel-Ingroff y col. permitieron determinar los valores de corte epidemiológicos (ECV, de sus siglas en inglés) del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* frente a los antifúngicos empleados en la primera línea de tratamiento de la criptococosis y otros de más reciente generación (Espinel-Ingroff, et al., 2012a; Espinel-Ingroff, et al., 2012b).

El cálculo del ECV está basado en la distribución de las CMI de dos poblaciones de aislamientos: aislamientos salvajes en el cual no se demuestra ningún valor de resistencia y aislamientos no salvajes que albergan al menos un marcador de resistencia. Esta variable es un indicador de la emergencia de cambios en los patrones de susceptibilidad de los microorganismos frente a los agentes evaluados y en ausencia de valores de corte basados parámetros de CMI, farmacocinética, farmacodinámica, estudios animales y respuesta clínica al tratamiento, permite el reconocimiento de resistencia antifúngica (Pfaller et al. 2011). De acuerdo a los criterios interpretativos adoptados en este trabajo, todos los especímenes estudiados mostraron susceptibilidad in vitro a los antifúngicos incluidos en el sistema ATB Fungus 3.

Aunque la mayoría de los trabajos precedentes se basaron en el estudio de un número más amplio de aislamientos, las cifras de CMI obtenidas aquí son similares a los ya publicados tanto en Cuba como internacionalmente (Illnait et al., 2008; Hagen et al., 2010a). Unos y otros reportes confirman una vez más que la resistencia in vitro no constituye un problema entre los aislamientos del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* y que los azoles pudieran ser una alternativa terapéutica eficaz en el tratamiento de la infección causada por este agente (Illnait et al., 2008; Hagen et al., 2010a; Vidal et al., 2013).

---

El tratamiento de la criptococosis es uno de los más estudiados hasta la fecha actual. Los trabajos publicados que abordan el manejo de los pacientes con esta infección, coinciden en que el régimen terapéutico recomendado se basa en la combinación de dos o más antifúngicos. El de elección consiste en la administración de anfotericina B y 5-fluorocitosina durante la primera etapa (inducción) seguido de las fases de consolidación y mantenimiento con fluconazol (Perfect *et al.*, 2010; Day *et al.*, 2013). No obstante aún resulta preocupante el hecho de que a pesar de los avances médicos, la tasa de mortalidad durante los tres primeros meses de tratamiento de la neurocriptococosis sobrepase el 20% de los pacientes afectados (Perfect *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2013). Algunos autores reportan casos de evidente asociación entre valores elevados de CMI para el fluconazol y el fracaso con el empleo de esta droga (Yildiran *et al.*, 2002). Hoy se sabe que otros factores diferentes a la resistencia antifúngica (deterioro del sistema inmune del hospedador, la presencia de otras enfermedades subyacentes, la prontitud con que se instaure la terapia y el manejo de la hipertensión endocraneana entre otros) son aspectos a considerar en los casos de fallos terapéuticos (Cuenca-Estrella, 2010).

Motivados por estos antecedentes se decidió realizar la revisión de las historias clínicas de los pacientes incluidos en este estudio para los cuales se confirmó microbiológicamente la infección por especies del complejo *C. neoformans/C. gattii*.

#### **Caracterización clínico-epidemiológicos de los pacientes con diagnóstico confirmado de criptococosis debido a *C. neoformans/C. gattii*.**

Hasta la década de los años 1950's, se habían reportado no más de 500 casos de criptococosis a nivel mundial. Esta cifra sufrió un incremento de 338 eventos confirmados en 1976 solo en EEUU. Durante los años siguientes, con el advenimiento del sida, le siguió una explosión de casos y posteriormente con la introducción de la TARVAE a mediados de los 1990's, una abrupta disminución de los mismos (Vidal *et al.*, 2013). No obstante la meningitis criptocócica afecta en la

---

actualidad cerca de 1 000 000 personas cada año, de las cuales más de 600 000 tienen un desenlace fatal (Pyrgos *et al.*, 2013).

En Cuba existen antecedentes de estudios de esta infección desde la era pre-sida hasta la introducción de la TARVAE durante el período epidémico causado por el VIH (Arteaga *et al.*, 1998; Torres, 2002; Illnait-Zaragozí *et al.*, 2013). No obstante, no existen evidencias de esta información después de introducida la terapia antirretroviral en este país a partir del 2002. Teniendo como premisa que todos los pacientes cubanos seropositivos al VIH reciben la TARVAE, se realizó un análisis de los datos recogidos de las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico confirmado de criptococosis durante el período que comprendió este estudio.

El examen directo con nigrosina de los LCR recibidos en el LM-IPK demostró una sensibilidad inferior al cultivo, especialmente en pacientes seronegativos al VIH. No obstante, estos porcentajes se encuentran en el rango de lo esperado según la literatura consultada (50% en los pacientes no-VIH y del 70-88% en los pacientes infectados con el VIH) (Pontón *et al.*, 2001). La sensibilidad de esta técnica depende de múltiples factores tales como la pericia del observador, la calidad del reactivo empleado, el modo de preparación de la lámina (la cantidad de tinta no debe ser excesiva ni escasa, ya que ambas circunstancias incrementan el riesgo de artefactos) y especialmente de aquellos dependientes del agente, ya que en ocasiones las levaduras muestran morfologías atípicas que dificultan su identificación o se encuentran en cantidades por debajo del límite de detección de la técnica ( $10^4$  cél/mL) (Quindós *et al.*, 2012). No obstante, este procedimiento es hasta el momento, una de las herramientas más empleadas para en el diagnóstico rápido de la criptococosis por su elevada especificidad en manos de personas bien entrenadas, así como por la posibilidad de obtener resultados en pocos minutos, su sencillez y bajo costo (Pontón *et al.*, 2001). En el curso de este trabajo el proceso fue supervisado por personal de experiencia lo que permitió minimizar los errores humanos.

---

Más de la mitad de los pacientes estudiados aquí resultaron ser portadores del VIH (2,5:1). Este resultado corrobora una vez más que esta condición resulta uno de los factores predisponentes más importantes para el desarrollo de criptococosis por *C. neoformans*. Este resultado coincide con la vasta colección de artículos; entre estos el publicado por Arteaga y cols. quienes revisaron los informes de 211 autopsias realizadas en el IPK a pacientes con sida y demostraron que esta micosis resultó un trastorno grave en el 29% de los fallecidos (Arteaga *et al.*, 1998). Otros autores internacionales, como Córdoba y cols. quienes condujeron el segundo estudio multicéntrico sobre fungemias debidas a levaduras en el período de julio a septiembre de 2011, encontraron que el 81,2% de las infecciones por *C. neoformans* tenían como factor predisponente la infección por VIH (Córdoba *et al.*, 2011). En otros países tanto de América Latina como de otros continentes, también se describe esta condición entre las más importantes para el desarrollo de la criptococosis por estar presente en más del 80% de los pacientes con esta micosis (Fernandes *et al.*, 2000; Simwami *et al.* 2011).

El 92,8% de los pacientes de este estudio presentaron alguna condición predisponente: además de la infección con el VIH el 7,1% estuvo asociado a trasplante renal e igual porcentaje a tratamiento esteroideo debido a una enfermedad autoinmune. En el 7,1% de los individuos no se pudo demostrar ningún antecedente patológico de importancia. Estos resultados también fueron previamente descritos por otros autores. Bratton y cols. por ejemplo, estudiaron 207 pacientes con diagnóstico de criptococosis realizado en la Universidad Médica de Duke en EEUU y reportaron que después del VIH, el trasplante renal es la condición más importante para el desarrollo de criptococosis (20% de los pacientes estudiados) mientras que el resto de los individuos quedaron incluidos en la condición VIH negativo/no trasplantado (Bratton *et al.*, 2012).

Otros de los factores de riesgo más importantes son: los tumores sólidos, los trastornos linfoproliferativos, la cirrosis hepática, la sarcoidosis, la diabetes, la insuficiencia renal, la linfocitopenia idiopática CD<sub>4</sub> específica y de manera muy

importante la terapia con esteroides (Fonseca *et al.*, 2011). En este estudio al menos uno de los pacientes recibía tratamiento con dexametasona (5 mg/d) debido a una psoriasis. Este factor puede condicionar la criptococosis *per se* o actuar como agravante cuando se suma a cualquiera de las causas ya mencionadas.

Uno de los paciente para el cual no se pudo demostrar ninguna enfermedad de base resultó estar infectado por *C. gattii*. A diferencia de *C. neoformans*, esta especie se considera actualmente como patógena verdadera ya que la misma constituye la principal responsable de los cuadros de criptococosis en pacientes seronegativos al VIH (Fonseca *et al.*, 2011). Esta es la primera evidencia de infección en humanos por esta levadura en Cuba como se expresó anteriormente, por lo que mereció un amplio estudio del caso.

Brevemente; se trataba de un médico colaborante cubano cuyo único antecedente consistió en ser fumador moderado y haber estado en Honduras (2003 - 2005) y Guatemala (2007 - 2009). Año y medio después de regresar de su última misión comenzó con cuadro respiratorio que se interpretó como neumonía bacteriana adquirida en la comunidad por lo cual recibió tratamiento empírico con penicilina intramuscular durante 7 días en su área de salud. Debido al empeoramiento del cuadro clínico, la aparición de cefalea, disminución de la agudeza visual del ojo derecho, reducción de la audición y deterioro del estado general, se decidió su ingreso hospitalario en Villa Clara, provincia de residencia y posteriormente el traslado al IPK. Una vez demostrada la presencia de levaduras capsuladas en el LCR, se comenzó el tratamiento antifúngico: anfotericina B (hasta 1 500 mg) + fluconazol (400 mg/d), lo cual fue re-emplazado inicialmente por anfotericina B liposomal (hasta 8 g) + fluconazol (800 mg/d) y posteriormente por voriconazol (800 mg/d durante 3 meses). Como terapia colateral se empleó punciones lumbares evacuadoras periódicas, IFN $\gamma$  (200  $\mu$ g tres veces por semana durante dos meses), inctablogin (50 y 400 mg/kg/d por 5 días) y medidas de soporte general entre otras. No obstante el paciente falleció un año después de diagnosticada la enfermedad

---

debido a las complicaciones propias de la misma (fuente: historia clínica del paciente).

*C. neoformans* y *C. gattii* comparten los principales mecanismos de adaptación y virulencia; sin embargo, la preferencia de uno y otro por determinado hospedero aún es un enigma, tal como lo son los casos de criptococosis por ambas especies documentados desde antes de la epidemia del sida (Ma y May, 2009). El estudio realizado anteriormente en Cuba en el 2002 arrojó que 13,2% de los pacientes no se encontraban infectados por el VIH (Torres, 2002). Aún después de la introducción de la TARVAE, la criptococosis permanece como una infección de importante morbi-mortalidad en los EEUU, donde Pyrgos y cols. registraron que de 30 840 casos procedentes de 18 estados de esta nación fueron hospitalizados por esta entidad entre 1997 y 2009; de ellos el 21,6% era seronegativo al VIH (Pyrgos *et al.*, 2013). Aunque el número de pacientes incluidos en el estudio de Pyrgos y cols es casi  $2 \times 10^3$  veces mayor, los resultados del presente trabajo muestran que el 28% de los casos analizados no mostraron evidencia de infección por el VIH.

Algunos autores lograron demostrar que defectos leves en los mecanismos de inmunidad que pudieran justificar el desarrollo de esta infección oportunista (Marroni *et al.*, 2007). Sin embargo, otros plantean que estas levaduras son capaces de causar enfermedad en individuos sin antecedentes patológicos personales (Casadeval y Prefect, 1998). En correspondencia con estos últimos, en el presente estudio los pacientes en los que no se logró demostrar ningún factor predisponente conocido, los exámenes inmunológicos realizados mostraron valores dentro de límites normales.

Si bien la infección con el VIH constituye la condición más frecuente para el desarrollo de criptococosis por *C. neoformans*, los estudios a raíz de la epidemia causada por *C. gattii* en la costa occidental de Norteamérica a partir de 2003, apuntan a que las afecciones respiratorias y el hábito de fumar parecen ser condiciones favorecedoras para el desarrollo de la infección por esta levadura (MacDougall *et al.*, 2011). Esta última condición pudo contribuir al desarrollo de la

---

infección en el paciente cubano descrito en esta corte según se describió previamente.

Aunque la infección por *C. gattii* no aparece en la lista de infecciones del viajero (Arguin y Tan, 2013), cada vez se recogen más evidencias de la asociación entre la enfermedad que ella ocasiona y la visita a lugares donde resulta endémica (Hagen et al., 2010b). Tal como se expresó anteriormente, en Cuba solo existe el antecedente de su recuperación a partir un guepardo importado desde Sudáfrica al Zoológico Nacional, el cual posiblemente arribó a la instalación con una infección latente adquirida en el lugar de procedencia (Polo et al., 2010; Illnait-Zaragozí et al., 2011). Otros estudios a partir de muestras ambientales cubanas no han logrado demostrar hasta la fecha la presencia de este agente en las mismas.

En los casos estudiados, la infección pudo estar asociada además a alguna condición predisponente del individuo, a la exposición a gran cantidad de inóculo o a la inhalación de levaduras hipervirulentas (Buchanan y Murphy, 1998). El papel de los atributos patogénicos del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* es un tema que ha merecido la atención de muchos investigadores desde el mismo momento en que esta levadura fue descrita por primera vez hace más de 100 años y aún hoy no está totalmente esclarecido (Fonseca et al., 2011).

La criptococosis puede ocurrir en todos los grupos de edades, sin embargo la mayoría de los autores coinciden en que generalmente los casos son diagnosticados entre los 20 y 50 años (Pasqualotto et al., 2004; Córdoba et al., 2011). En este rango de edad se encuentran los pacientes de nuestro estudio. No obstante, existen evidencias de que esta micosis puede presentarse también en niños (Severo et al., 2009; Illnait-Zaragozí et al., 2013) y en edades más avanzadas (Jean et al., 2002). Estos últimos autores realizaron un estudio en Corea (2001-2009) y encontraron además, que el sexo predominante fue el masculino entre los pacientes con VIH (11:1)

(Jean et al., 2002). Resultados similares fueron revelados durante la revisión de las historias clínicas de los pacientes con y sin sida incluidos en este trabajo (2,3:1 y 3:1

---

respectivamente). La tesis desarrollada en el 2002 por Torres también demostró el predominio del sexo masculino al comparar 72 pacientes cubanos con criptococosis en el curso del sida vs 11 sin sida (3,5:1 y 2,6:1 respectivamente) entre 1996 y junio del 2001 (Torres, 2002). Esto demuestra que la variable sexo, no sufrió modificaciones después de 10 años a pesar de la introducción de la TARVAE en Cuba.

Estudios experimentales demostraron que la presencia de dietilestilbestrol suele inhibir el crecimiento del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* en los medios de cultivo (Restrepo *et al.*, 1984). Este resultado además, fue demostrado in vivo mediante modelos animales, los cuales evidenciaron que los ratones machos son más sensibles a la infección que las hembras; en última instancia, la resistencia a la infección criptococosa podría simplemente estar determinada genéticamente (Marquis *et al.*, 1985). Estas revelaciones pudieran explicar las bases de la mayor morbimortalidad que causan algunos hongos, incluyendo *C. neoformans/C. gattii*, entre los hombres. En la población de individuos que viven con VIH/sida, estas causas son potenciadas por la mayor prevalencia de esta condición inmunosupresora en el sexo masculino (Casadevall y Perfect, 1998).

Si bien ciertos investigadores reportan que como reflejo de una pobre respuesta inflamatoria, los pacientes con criptococosis asociada al sida suelen desarrollar pocas manifestaciones (Dismukes, 2000), otros plantean que de forma general no existen diferencias significativas entre este grupo y los que son seronegativos al VIH, siendo los síntomas y signos neurológicos los más frecuentes (Casadevall, 2010).

Debido a que fue imposible recuperar los datos clínico-epidemiológicos del paciente N° 34, los análisis subsiguientes relacionados con estos aspectos, así como con el tratamiento y la respuesta al mismo, para el análisis de los resultados consideramos como número de pacientes seronegativos al VIH  $n = 3$  y como total de casos  $n = 13$ .

La experiencia adquirida durante la realización de este trabajo apunta a que de manera general, teniendo en cuenta los casos en que fue posible obtener los datos a

---

patir de la historia clínica o la orden de análisis, al menos la mitad de los pacientes presentaron cefalea (69%), signos de focalización neurológica y fiebre (62%). Estos estuvieron seguidos en orden de frecuencia por las manifestaciones de alteración de conciencia (46%), las náuseas (38%), los signos meníngeos (31%) y la fotofobia (8%). Esta última es una manifestación frecuentemente relacionada con la infección por el complejo de especies *C. neoformas/C. gattii* (Bratton *et al.*, 2012); sin embargo, en este estudio solo fue descrita en la historia clínica del paciente afectado por *C. gattii*. De forma general, estos resultados también coinciden con lo reportado anteriormente en Cuba (Torres, 2002) y en otros países (Chowdary *et al.*, 2012; Chowdary *et al.*, 2013). Durante la revisión de la base de datos de los casos de criptococosis en Asia, los autores de los trabajos describieron como principal síntoma y signo de presentación la cefalea (70 - 87%) y la fiebre (50 - 74%) respectivamente, en tanto que otras manifestaciones aparecieron en frecuencia menor y variable entre los grupos estudiados (Lee *et al.*, 2011; Yuchong *et al.*, 2011).

Más de 100 especies de microorganismos, incluidos virus, bacterias, hongos y protozoos son causa de infecciones oportunistas en pacientes con sida. Sin embargo, el número de agentes que producen infecciones con periodicidad y severidad tal como para definir un caso como sida es mucho menor (Llop *et al.*, 2001). Los pacientes con VIH que sufren de estas patologías, ya sea de manera independiente o asociadas entre sí, suelen presentar deterioro de la inmunidad mediada por células. De forma significativa, los linfocitos TCD4<sup>+</sup>, mediadores fundamentales de esta línea de defensa, suelen encontrarse por debajo de 200 cél/mL (Bell y Khabbaz, 2013). Es habitual que en los pacientes aquejados de criptococosis se encuentren asociadas otras enfermedades oportunistas. Entre las más frecuentes se encuentran la candidiasis orofaríngea, la infección pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* y la toxoplasmosis cerebral entre otros (Llop *et al.*, 2001), lo cual coincide con lo encontrado en este estudio. De igual forma los pacientes cubanos anteriormente estudiados presentaron como principal enfermedad asociada la candidiasis oral (Torres, 2002). En el sudeste asiático, se reporta como

---

enfermedad más asociada a criptococosis, a la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (36,4%) seguido por la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (27,3%) (Lee *et al.*, 2011). Esta diferencia en relación a nuestro ensayo pudiera deberse a que en Cuba no está bien establecido el diagnóstico microbiológico de *P. jirovecii* (el tratamiento se indica sobre la base de la sospecha clínico-epidemiológica) y a la no existencia de programas de control adecuados con vistas a la erradicación de la tuberculosis en los países donde el mismo se reporta con mayor incidencia.

Durante la criptococosis, la integridad y funcionabilidad de la inmunidad celular es crucial en la defensa del hospedero contra el agente causal de la infección ya que el principal factor predisponente en el desarrollo de la enfermedad es la disminución del conteo de linfocitos TCD4<sup>+</sup> (Bratton *et al.*, 2012). Lo anterior se corresponde con lo encontrado en Cuba en el 2002 cuando se demostró que el 80,5% de los pacientes con VIH tenían cifras de TCD4<sup>+</sup> inferiores a 200 cél/mm<sup>3</sup> (Torres, 2002). En concordancia con lo anteriormente reportado, en este estudio el 90% de los pacientes con sida presentaron resultados similares en los controles hematológicos. Los pacientes sin sida no se evidenciaron alteraciones de este parámetro. No obstante, tal y como fue demostrado anteriormente, niveles normales de celularidad en sangre no descartan la presencia de infección criptocócica (Torres, 2002). Estos resultados sustentan el planteamiento de que la linfopenia *per se*, es insuficiente para el desarrollo de la criptococosis y que otros factores dependientes del hospedero (diferentes de la linfopenia) y del agente (cuantía del inóculo y virulencia del microorganismo) pudieran ser decisivos en el curso de la infección (del Poeta y Casadevall, 2011; Perfectet *et al.*, 2010).

De igual manera el estudio de Torres en Cuba demostró que el análisis citoquímico del LCR en los pacientes seropositivos al VIH con criptococosis meníngea, puede ser normal o mostrar alteraciones mínimas (Torres, 2002). Este aspecto, debe ser del dominio de los médicos asistenciales y lo que se recomienda es realizar determinaciones seriadas e insistir en estudios más específicos en busca del agente etiológico tal como el examen con tinta china, la detección de antígeno y el cultivo

---

(Escandón *et al.*, 2013). De otra parte, en los pacientes seronegativos la hiperproteíorraquia, la pleocitosis linfocítica y la hipoglucorraquia fueron hallazgos frecuentes (Torres, 2002). En este trabajo los pacientes con y sin sida, presentaron alteraciones en el estudio citoquímico del LCR, en cuanto a las cifras de proteínas ( $> 0,45$  g/L) y del conteo de linfocitos ( $> 5$  cél/mm<sup>3</sup>). Las divergencias con el estudio de Torres puede deberse a la diferencia del tamaño de la muestra ( $n = 83$ ), ya que este era mayor que la incluida en este trabajo ( $n = 14$  y en uno de ellos no se pudo obtener estos datos).

La neurocriptococosis, además de ser considerada como marcadora del sida es la micosis de mayor letalidad en este grupo de personas. Los reportes reflejan una mortalidad del 60% a pesar del tratamiento antifúngico convencional. Esta cifra alcanza el 100% en los pacientes no tratados o con tratamientos iniciados tardíamente (Perfect *et al.*, 2010). Solo en Africa sub-Sahariana ocurren más de 500 000 muertes cada año debido a esta infección, lo cual excede aquellas atribuidas a la tuberculosis. En general, el 10- 30% de los individuos que sobreviven al episodio inicial, tienen alta tendencia a presentar recaídas a pesar de la implementación de las medidas recomendadas (Park *et al.*, 2009; Perfect *et al.*, 2010, Vidal *et al.*, 2013).

En este estudio, el 21,4% de los pacientes presentaron recidivas lo cual se corresponden con lo reportado anteriormente. La mayoría de los autores sugieren que la persistencia/recurrencia o desenlace fatal durante la criptococosis, pudiera deberse a la recaída de la infección por el aislamiento original, la reinfección con un nuevo espécimen o al fenómeno de resistencia a los antifúngicos (Litvintseva *et al.*, 2005). Más recientemente quedó demostrado que factores tales como la virulencia del agente, el deterioro del sistema inmune del individuo, la presencia de otras enfermedades subyacentes, la prontitud con que se instaura la terapia y el manejo de la hipertensión endocraneana, también son aspectos a considerar en los casos de fallos terapéuticos (Vidal *et al.*, 2013). Otros autores añaden a esta lista, la co-infección con diferentes aislamientos o variedades genéticamente modificadas como

---

posible mecanismo de recurrencia (Jain y Fries, 2008; Illnait-Zaragoz et al., 2010b) lo cual no fue explorado en este trabajo.

Cuatro pacientes fallecieron (28,57%), dos de ellos en el curso de la terapia de ataque. Este hecho es ampliamente reconocido en la literatura y es asociado a cifras elevadas de presión intracraneal como resultado de la mayor resistencia al flujo normal del LCR resultante, al menos en parte, a los conglomerados de células levaduriformes muertas y las grandes cantidades del polisacárido capsular circulantes (Perfect et al., 2010; Trk et al., 2010). Estudios tempranos en el curso de la epidemia del sida establecieron tasas de mortalidad por criptococosis de un 12% durante la primera semana (ligeramente inferior a la de este trabajo), 21% a las seis semanas y 29% durante el período de enfermedad activa (Darras-Joly et al., 1996). Trabajos posteriores reportan tasas de mortalidad de hasta el 54% en las dos semanas iniciales y 64% durante el tiempo de hospitalización (Moosa et al., 1997).

El régimen actualmente recomendado para el manejo de la criptococosis está basado en la administración de anfotericina B (0,7-1 mg/kg/día) más 5-fluorocitosina (100 mg/kg/día divididas en 4 dosis) durante 2 semanas, seguido de fluconazol (400 mg/d durante un mínimo de 8 -10 semanas). En los pacientes infectados por el VIH que completaron con éxito el curso inicial de la terapia, se encuentran libres de síntomas de criptococosis y logran reconstituir el recuento de CD4<sup>+</sup> por encima de 200 cl/mm<sup>3</sup> durante más de 6 meses, la terapia supresora con fluconazol (200 mg/d) puede ser interrumpida. Sin embargo, dicha terapia debe mantenerse o reiniciarse siempre que el recuento de CD4<sup>+</sup> del paciente refleje valores subnormales (< 200 cl/mm<sup>3</sup>) (Perfect et al., 2010).

Durante la década de 1970, la 5-fluorocitosina se estableció como un agente disponible por la vía oral, con una potente actividad frente a *C. neoformans* (Cuenca-Estrella et al., 2010). A pesar de que esta actividad suele perderse rápidamente debido al desarrollo de resistencia cuando se usa el fármaco como monoterapia, la adición de la misma a la anfotericina B resultó en el incremento de la supervivencia de los pacientes y la reducción del tiempo de tratamiento (de 10 a 4-6 semanas)

---

dependiendo del estado del individuo al inicio de los síntomas (Day *et al.*, 2013; Perfect *et al.*, 2010). Otras alternativas durante la terapia de ataque incluyen formulaciones lipídicas de anfotericina B (4-6 mg/kg/día durante 3 semanas) y el fluconazol en dosis que varían desde 400 hasta 800 mg/día, sola o combinada con 5-fluorocitosina en pacientes que no toleran la anfotericina B. Sin embargo, esta última combinación es menos efectiva que el esquema recomendado (Nucci y Perfect, 2008; Day *et al.*, 2013).

De manera general, todos los individuos recibieron tratamiento de acuerdo a las normas vigentes (Perfect *et al.*, 2010). No obstante, debido a la no disponibilidad de 5-fluorocitosina en Cuba durante el tiempo del estudio, este medicamento no fue administrado a los pacientes incluidos en este trabajo. En su lugar la anfotericina B se asoció a fluconazol el cual se empleó además como terapia de mantenimiento en seis de los pacientes para los cuales se logró obtener información de la historia clínica.

Paralelamente al incremento de la incidencia global de las infecciones oportunistas, se ampliaron las opciones terapéuticas disponibles para el manejo de las mismas. En la actualidad, además de los antifúngicos mencionados, existen otros como las formulaciones lipídicas de anfotericina B, el voriconazol, el posaconazol, el ravuconazol, el isavuconazol, etc, los cuales se pueden usar solos o en combinación con otros agentes con diversos grados de éxito (Nucci y Perfect, 2008; Day *et al.*, 2013). Durante la revisión de las historias clínicas se pudo constatar que al menos en el paciente infectado por *C. gattii*, se administró además del tratamiento convencional otras alternativas dadas por antifúngicos de más reciente generación y medicamentos inmunomoduladores. Estos últimos tienen como propósito tratar de restablecer el equilibrio del sistema inmune y coadyuvar el efecto de las drogas antifúngicas (Casadevall y Pirofski, 2001, La Hoz y Pappas, 2013). A pesar de todos los esfuerzos realizados, el paciente falleció durante el tratamiento un año después de iniciado el mismo.

El análisis de los datos aportados por el registro de resultados del LM-IPK indican que desde 2003 (año en que se generalizó el empleo de la TARVAE en Cuba) hasta la fecha, se diagnostican en este laboratorio como promedio anual cuatro pacientes más con criptococosis que el año anterior (intervalo 1-15); no obstante, esta enfermedad es considerada como poco frecuente. Esto, sumado a que la sintomatología de inicio suele ser muy discreta y poco característica, hace que se requiera de un alto índice de sospecha clínico-epidemiológica para establecer un diagnóstico precoz. La presencia de fiebre y cefalea persistentes en los pacientes VIH, deben ser criterios suficientes para realizar examen directo del LCR con tinta china o nigrosina y estudios microbiológicos que permita confirmar o descartar la enfermedad.

A pesar de que de forma general, la resistencia in vitro a los antifúngicos empleados en la primera línea de tratamiento, no parece ser un problema en el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, la infección resulta fatal cuando no se impone una terapéutica específica de forma oportuna. No obstante, la letalidad por esta micosis, aún en los enfermos tratados se encuentra por encima de lo permisible, por lo que el manejo del paciente con criptococosis es un tema no resuelto, objeto de constante estudio e investigación. Por su parte, la posibilidad de realizar estudios de los posibles nichos ecológicos de estas levaduras e implementar métodos de caracterización molecular brindaron a los resultados de este estudio mayor confiabilidad y argumentos epidemiológicos de rigor. Esta experiencia resulta de gran importancia con vistas a incrementar el índice de sospecha clínica y la calidad del diagnóstico microbiológico en el LM-IPK.

## VII. CONCLUSIONES

- A pesar del amplio número de muestras ambientales incluidas en el presente trabajo, los métodos moleculares descartaron la presencia de *Cryptococcus* spp. en los nichos ecológicos estudiados. Estos resultados reafirman la necesidad de ampliar la búsqueda de posibles fuentes de infección y de confirmar mediante métodos moleculares la identificación de aislamientos ambientales.
- El diagnóstico de la infección por *C. gattii* constituye un gran reto. El presente trabajo constituye el primer reporte de aislamiento de este agente a partir de muestras clínicas humanas en Cuba, lo cual sirve de experiencia y sienta las bases para futuros trabajos sobre su epidemiología en este país.
- Por primera vez en Cuba se demostró la presencia de *Candida haemulonii* como agente causal de infección del SNC lo que constituye una alerta para el personal de salud y obliga a la realización de estudios clínico-epidemiológicos en torno a los pacientes afectados.
- Todos los aislamientos de *C. neoformans* incluidos en este estudio corresponden al serotipo A tipo de apareamiento  $\alpha$ , lo que ratifica resultados previos obtenidos en el LM-IPK. No obstante, estos mostraron amplia diversidad genética según la caracterización molecular empleada en este trabajo, lo que sugiere que los mismos no se hayan epidemiológicamente relacionados.
- A pesar de la instauración del esquema antifúngico recomendado y de que todos los aislamientos estudiados son sensibles a las drogas empleadas, los porcentajes de recaída y mortalidad fueron similares a lo descrito con anterioridad, lo que confirman la severidad de la infección criptocócica, especialmente cuando es producida por *C. gattii* y la necesidad de realizar un diagnóstico precoz.
- Después de 10 años de iniciada la TARVAE en Cuba, la principal condición predisponente para el desarrollo de la criptococosis continúa siendo la infección por el VIH. No obstante, la ausencia de esta u otra condición inmunodepresora no descarta la posibilidad de infección por *Cryptococcus* spp. .

## VIII. RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios ambientales con vistas a determinar la presencia de otros nichosecológicos como posibles fuentes de infección por el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* en Cuba.
- Realizar los estudios fisiológicos necesarios para la completa identificación de las especies aisladas a partir de material vegetal y estudiar su potencial patogénico.
- Determinar en los aislamientos que pertenecen a una misma agrupación genotípica patrones de virulencia, mediante métodos moleculares y modelos animales.
- Continuar los estudios donde se incluyan más aislamientos de pacientes con criptococosis, que permitan arribar a conclusiones más robustas en cuanto a la caracterización de *C. neoformans/C. gattii* en Cuba.

IX.  
REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

## IX. Referencias Bibliográficas

---

1. Arguin PM, Tan KR. Yellow Book, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta: Georgia; 2013.
2. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; 45: 569-87.
3. Arteaga E, Capó de Paz V, Pérez-Fernández-Terán ML. Micosis oportunistas invasivas en el sida. Un estudio de 211 autopsias. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 33-5.
4. Barreto de Oliveira MT, Boekhout T, Theelen B, Hagen F, Baroni FA. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1356-9.
5. Bell BP, Khabbaz RF. Responding to the outbreak of invasive fungal infections. *J Am Med Assoc* 2013; 309: 883-4.
6. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Dromer F, *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2001; 147: 891-907.
7. Bonifaz A. Criptococosis. En: *Micología Médica Básica*: México, D.F: Méndez Cervantes; 2012.
8. Boulware DR, Rolfes MA, Rajasingham R *et al.* Multisite validation of Cryptococcal antigen lateral flow assay and quantification by laser thermal contrast. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 45-53.
9. Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: S4-12.
10. Bratton EW, El Hussein N, Chastain CA, Lee MS, Poole C, Stürmer T, *et al.* Comparison and temporal trends of three groups with Cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. *PLoS One* 2012; 7: e43582. Doi: 10.1371/journal.pone.0043582
11. Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 71-83.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

12. Byrnes EJ III, Li W, Lewit Y, Perfect JR, Carter DA, Cox GM, Heitman J. First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: Implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen. PLoS One 2009; 4: 1-12.
13. Cabral LF. Wood, animals and human beings as reservoirs for *human Cryptococcus neoformans* infection. Rev Iberoam Micol 1999; 16: 40-2.
14. Casadevall A, Pirofski L. Adjunctive immune therapy for fungal infections. Clin Infect Dis 2001; 33: 1048-56.
15. Casadevall A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? J Clin Invest 2010; 120: 1389-92.
16. Casadevall A., Perfect JR. Human Cryptococcosis. *Cryptococcus neoformans*. Ed. ASM Press. Washington DC.1998: pp. 407-56.
17. Castañón LR, Martínez K, Bermúdez RM, Martínez MA, Meyer W, Arreguín RA *et al*. Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. Med Mycol 2009; 47: 713-21.
18. Chae HS, Jang GE, Kim NH, Son HR, Lee JH, Kim SH, *et al*. Classification of *Cryptococcus neoformans* and yeast-like fungus isolates from pigeon droppings by colony phenotyping and ITS genotyping and their seasonal variations in Korea. Avian Dis 2012; 56: 58-64.
19. Champa S, Xess I, Biswas A, Dipankar M. Bhowmik M. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. J Med Microbiol 2009; 58: 1098-105.
20. Chen J, Varma A, Díaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerg Infect Dis 2008; 14: 755-62.
21. Chowdhary A, Prakash A, Randhawa HS, Hagen F, Klaassen CH, Meis JF. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. Mycoses 2013; 56: 222-8.
22. Chowdhary A, Randhawa HS, Prakash A, Meis JF. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in India: an update. Crit Rev Microbiol 2012; 38: 1-16.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27–A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
24. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, *et al* and The Red Nacional de Laboratorios de Micología, Argentina. *Rev Argent* 2011; 43: 176-85.
25. Cossío O, Cantón L, Estrada R, Vidal R, Galarraga J, Castillo F. Micosis del SNC: Descripción de 6 casos. *Rev Cubana Med Trop* 1972; 24: 30-5.
26. Costa JJ, Cordeiro AK, Freire RA, Cordeiro RA, Nogueira RS, Araújo FE *et al*. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can J Microbiol* 2010; 56: 445-58.
27. Cowen LE. The fungal Achilles' heel: targeting Hsp90 to cripple fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16: 377-84.
28. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23: 169-76.
29. Darras-Joly C, Chevret S, Wolff M, Matheron S, Longuet P, Casalino E, *et al*. *Cryptococcus neoformans* infection in France. Epidemiologic features of and early prognostic parameters for 76 patients who were infected with HIV. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 369-76.
30. Datta K, Bartlett KH, Baer R, Byrnes E, Galanis E. and the *Cryptococcus gattii* Working Group of the Pacific Northwest. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1185-91.
31. Day JN, Chau TTH, Wolbers M, Mai PP, Dung NT, Mai NH *et al*. Combination of antifungal therapy for Cryptococcal meningitis. *N Engl J Med* 2013; 368:1291-302.
32. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Baarn/Reus: Centraalbureau voor Schimmel cultures/Universitat Rovirai Virgili, 2009.
33. del Poeta M, Casadevall A. Ten challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *Mycopathologia* 2011. Doi: 10.1007/s11046-011-9473-z.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

34. Dismukes WE. *Cryptococcus neoformans*. En: Bennett JC, Plum F, editores. Tratado de Medicina Interna, 21<sup>a</sup> ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana. 2000: pp. 457-72.
35. Drouhet E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. J Mycol Med 1997; 7: 10-27.
36. Ellis DH, Pfeiffer TJ. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. Eur J Epidemiol 1992; 8: 321-25.
37. Escandón P, Lizarazo J, Agudelo CI, Chiller T, Castañeda E. Evaluation of a rapid lateral flow immunoassay for the detection of cryptococcal antigen for the early diagnosis of Cryptococcosis in HIV patients in Colombia. Med Mycol 2013; 51: 765-8.
38. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S *et al.* *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 5898-906(a).
39. Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca M, Fothergill A, Fuller J, Hagen F, *et al.* *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin b and flucytosine. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56: 3107-13(b).
40. Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W, Wu J. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV infected patients. FEMS Yeast Res 2008; 50: 1-9.
41. Fernandes O, Costa TR, Costa MR, Ailton J, Soares JS, Silva MR. *Cryptococcus neoformans* aislados de pacientes com sida. Rev Soc Bras Med Trop 2000; 5: 121-98.
42. Fernández CM, Martínez GF, Illnait MT, Perurena MR, González M. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en aislamientos clínicos cubanos. Rev Cubana Med Trop 1998; 50: 167-9.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

43. Fonseca A, Boekhout T, Fell JW. *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier Science & Technology, Amsterdam; 2011: pp. 1665-741.
44. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol 1999; 37: 838-40.
45. Gazzoni AF, Oliveira F, Salles Ef, Mayayo E, Guarro J, Capilla J, *et al.* Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 cases. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2010; 52: 145-9.
46. Giusiano G, Magianterra M, García Saito V, Rojas F, Gómes V, Días MC. Fluconazole and itraconazole resistance of yeasts isolated from the bloodstream and catheters of hospitalized pediatric patients. Chemotherapy 2006; 52: 254-9.
47. Grinsell M, Weinhold LC, Cutler JE, Han Y, Kozel TR. In vivo clearance of GXM, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*: a critical role for the tissue macrophages. J Infect Dis 2001; 184: 479-87.
48. Hagen F, Boekhout T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. Mycopathologia 2010; 70: 209-11.
49. Hagen F, Illnait MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH *et al.* In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* Isolates. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 5139-45(a).
50. Hagen F, Van Assen S, Luijckx GJ, Boekhout T, Kampinga GA. Activated dormant *Cryptococcus gattii* infection in a Dutch tourist who visited Vancouver Island (Canada): a molecular epidemiological approach. Med Mycol 2010; 48: 528-31(b).
51. Hamasha AM, Yildiran ST, Gonlum A, Saracli MA, Doganci L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of Eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. Mycopathologia 2004; 158: 195–9.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

52. Hiremath SS, Chowdhary A, Kowhik T, Randhawa HS, Sun S, J Xu. Long-distance dispersal and recombination in environmental populations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from India. *Microbiol* 2008; 154: 1513-24.
53. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, Chen YC, Liao MH, Lin YH *et al.* Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2003; 52: 1071-6.
54. Ikeda R, Sugita T, Facobson ES, Shinoda T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1214-8.
55. Illnait-Zaragozí MT, Hagen F, Fernández CM, Martínez GF, Polo JL, Boekhout T *et al.* Reactivation of a *Cryptococcus gattii* infection in a cheetah (*Acinonyx jubatus*) held in the National Zoo, Havana, Cuba. *Mycoses* 2011; e889–e892. Doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02046.
56. Illnait-Zaragozi MT, Martínez GF, Fernández CM, Marchena JJ, Perurena MR. Contribución al estudio de la criptococosis infantil en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2013; 65: 78-89.
57. Illnait-Zaragozi MT, Martínez-Machín GF, Curfs-Breuker I, Fernández-Andreu CM, Boekhout T, Meis JF. *In vitro* activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1580-2.
58. Illnait-Zaragozi MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Boekhout T, Meis JF, Klaassen CH. Microsatellite typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. *Plos One* 2010; 5: e9124. Doi: 10.1371(a).
59. Illnait-Zaragozí MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Hagen F, Boekhout T, Klaassen CH, Meis JF. Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 289. Doi: 10.1186/1471-2334-10-289(b).
60. Illnait-Zaragozí MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Perurena-Lancha MR, Theelen B, Boekhout T, *et al.* Environmental isolation and

## IX. Referencias Bibliográficas

---

- characterization of *Cryptococcus* species from living trees in Havana City, Cuba. *Mycoses* 2012; 550: 138-44.
61. Jain N, Fries BC. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia* 2008; 166: 181-8.
  62. Jean SS, Fang CT, Shau WY, Chen YC, Chang SC, Hsueh PR *et al.* Cryptococccemia: clinical features and prognostic factors. *Q J Med* 2002; 95: 511-8.
  63. Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekely A, Hockey H, Troke P. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies *Int J Antimicrob Agent* 2008; 32: 511-4.
  64. Katsu M, Kidd S, Ando A, Moretti-Branch, Mikami Y, Nishimura K, Meyer W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *FEMS Yeast Res* 2004; 4: 377-88.
  65. Khan ZU, Al-Sweih NA, Ahmad S, Al-Kazemi N, Khan S, Joseph L, *et al.* Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin b, itraconazole and fluconazole. *J ClinMicrobiol* 2007; 45: 2025-27.
  66. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection* 2007; 35: 51-8.
  67. Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, *et al.* Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the pacific northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 1433-43.
  68. Kim MN, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, Ryoo N, *et al.* *Candida haemulonii* and closely related species at university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 57-61.
  69. Kim S, Soo K, Yeon S, Suk M, Young M, Seong J. Catheter-related candidemia caused by *Candida haemulonii* in a patient in long-term hospital care. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 297-300.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

70. Koneman EW, Robert GD. Micología. Práctica de Laboratorio. 3era edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1987: pp. 184-5.
71. Kozubowski L, Heitman J. Profiting a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 78-94.
72. Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. Nat Rev Microbiol 2011; 9: 193-203.
73. Kumar CP, Prabu D, Mitani H, Mikami Y, Menon T. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. Mycoses 2009; 53: 262-4.
74. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Wickes BL, Fell JW. Systematics of the genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. In: *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. Heitman J. Washington, DC casa editorial (ed) ASM Press; 2011: pp. 3-15.
75. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol 1982; 15: 535-7.
76. La Hoz RM, Pappas PG. Cryptococcal infections: changing epidemiology and implications for therapy. Drugs 2013; 73: 495-504.
77. Lavarde V, Daniel F, Saez H, Arnold M, Faguer B. Peritonite mycosique a *Torulopsis haemulonii*. Bul Soc Fr Mycol Med 1984; 13: 173-6.
78. Lazera MS, Salmito MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Myco 2000; 38: 379-83.
79. Lee SJ, Kyoung H, Son J, Hyung K, Hee S. Cryptococcal Meningitis in patients with or without human immunodeficiency virus: experience in a tertiary hospital. Yonsei Med J 2011; 52: 482-7.
80. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol 2006; 60: 69-105.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

81. Lin X, Nielsen K, Patel S, Heitman J. Impact of mating type, serotype, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2008; 76: 2923-38.
82. Litvintseva AP, Kestenbaum L, Vilgalys R, Mitchell TG. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 556-64.
83. Litvintseva AP, Mitchell TG. Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) are not lethal for mice. *Infect Immun* 2009; 77: 3188-95.
84. Llop A, Valdés- Dapena Vivanco M, Zuazo Silva J. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001.
85. Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* species. In Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM, editors: *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 67, Burlington, UK. Academic Press; 2009: pp. 131-190.
86. MacDougall L, Fyfe M, Romney M, Starr M, Galanis E. Risk Factors for *Cryptococcus gattii* Infection, British Columbia, Canada. *Emerg Infect* 2011; 17: 193-9.
87. Maganti H, Bartfai D, Xu J. Ecological structuring of yeasts associated with trees around Hamilton, Ontario, Canada. *FEMS* 2011. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00756.x.
88. Marquis G, Montplaisir S, Pelletice M, Mousseau S, Auger P. Genetic resistance to murine cryptococcosis increased susceptibility in the CBAIN XID mutant strain of mice. *Infect Immun* 1985; 47: 282-7.
89. Marroni M, Pericolini E, Cenci E, Bistoni F, Vecchiarelli A. Functional defect of natural immune system in an apparent immunocompetent patient with pulmonary cryptococcosis. *J Infect* 2007; 54: e5-e8. Doi:10.1016/j.jinf.2006.03.018.
90. McGinnis MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. Academic Press, Inc. London, LTD. 1980.
91. McMullan BJ, Halliday C, Sorrell TC, Judd D, Sleiman S, Marriott D, *et al.* Clinical utility of the cryptococcal antigen lateral flow assay in a diagnostic mycology laboratory. *PLoS One* 2012; 7: e49541.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

92. McTaggart L, Richardson SE, Seah C, Hoang L, Fothergill A. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests differential. J Clin Microbiol 2011; 49: 2522-7.
93. Metin B, Findley K, Heitman J. The mating type locus (*MAT*) and sexual reproduction of *Cryptococcus heveanensis*: Insights into the evolution of sex and sex-determining chromosomal regions in fungi. PLoS Genet 2010; 21: 132-103.
94. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E and the Iberoamerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing, *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerging Infect Dis 2003; 9: 189-95.
95. Mihara T, Izumicawa K, Kakeya H, Ngamskulrungraj P, Umeyama T. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki. Japan Medical Mycology Month 2012; 3: 56-79.
96. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 515-48.
97. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of Sao Paulo. Brazil. Med Mycol 2000; 38: 385-90.
98. Moosa MY, Coovadia YM. Cryptococcal meningitis in Durban, South Africa: a comparison of clinical features, laboratory findings, and outcome for human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. Clin Infect Dis 1997; 24: 131-4.
99. Netea MG. Toward identification of the genetic risk profile for cryptococcal disease in HIV-infected patients. mBio 2013; 4: e00798-13.44
100. Nobrega de Almeida J, Lopes A, Rossi F, Abdala F, Camera L, Gonçalves AS *et al.* First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. Clinics 2012; 67: 1229-31.
101. Nosanchuk JD, Ovalle R, Casadevall A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. J Infect Dis 2001; 183: 1093-9.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

102. Nucci M, Perfect JR. When primary antifungal therapy fails. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1426-33.
103. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/aids. *AIDS* 2009; 23: 525-30.
104. Pasqualotto AC, Severo CB, Oliveira FM, Severo LC. Cryptococemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 143-6.
105. Pérez J, Torres R, Yoanes J, Terry H. HIV infection in Cuba. *AIDS Infekt.* 1993; 8: 1-9.
106. Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we do know now. *Fungal Genet Biol* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.003>
107. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 291-322.
108. Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Med Res Opin* 2013; 29: 3-11.
109. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, posaconazole and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* by CLSI broth microdilution methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 252-9.
110. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Bijie H, Dzierzanowska D, *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of non-candidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 111-23.
111. Pitisuttithum P, Tansuphasawadikul S, Simpson AJH, Howe PA, White NJ. A prospective study of aids-associated cryptococcal meningitis in Thailand treated with high-dose amphotericin B. *J Infection* 2001; 43: 226-33.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

112. Polacheck I, Kwon-Chung KJ. Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agen Chemother 1996; 29: 468-73.
113. Polo JL, Fernández CM, Martínez GF, Illnait MT, Perurena MR. *Cryptococcus gattii* aislado de un guepardo (*Acinonyx jubatus*) del Parque Zoológico Nacional de Cuba. Rev Cubana Med Trop 2010; 62: 257-60.
114. Pontón J, García ME, López-Medrano R. Diagnóstico basado en métodos independientes del cultivo. En: Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Rev Iberoam Micol 2001; 1: 1-21.
115. Pryce TM, Palladino S, Price DM, Gardam DJ, Campbell PB, Christiansen KJ, et al. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/ALERT, BACTEC, and BBL MGIT media using polymerase chain reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54: 289-97.
116. Pyrgos V, Seitz AE, Steiner CA, Prevots DR, Williamson PR. Epidemiology of Cryptococcal meningitis in the US: 1997–2009. Plos One 2013; 8: 562-9.
117. Quindós G, Eraso E, López-Soria LM, Ezpeleta G. Enfermedad fúngica invasora: diagnóstico micológico convencional o molecular? Enferm Infecc Microbiol Clin 2012; 30: 560-71.
118. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol 2003; 41: 199-209.
119. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. Med Mycol 2005; 43: 67-71.
120. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implication for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. Infect Immun 1984; 46: 346-53.
121. Rezusta A, Sánchez A, Gil J. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. En: Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Rev Iberoam Micol 2001, 1: 1-21

## IX. Referencias Bibliográficas

---

122. Rippon JW. Medical Mycology the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1998.
123. Rodero L, Cuenca-Estrella M, Córdoba S, Cahn P, Davel G, Kaufman S, *et al.* Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. J Clin Microbiol 2002; 40: 2266-9.
124. Rohatgi S, Gohil S, Kuniholm MH, Schultz H, Dufaud C, Armour KL, *et al.* Fc gamma receptor 3A polymorphism and risk for HIV-associated cryptococcal disease. mBio 2013; 4: e00573–13.
125. Ruan SY, Kuo YW, Huang CT, Hsiue HC, Hsueh PR. Infections due to *Candida haemulonii*: species identification, antifungal susceptibility and outcomes. Int J Antimicrob Agents 2010; 35: 85-8.
126. Ruane PJ, Walker LJ, George WL. Disseminated infection caused by urease-negative *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1988; 26: 2224-5.
127. **Sajadi MM, Roddy KM, Chan-Tack KM, Forrest GN.** Risk factors for mortality from primary Cryptococcosis in patients with HIV. Postgrad Med 2009; 121: 107-13.
128. Severo CB, Xavier MO, Gazzoni AF, Severo LC. Cryptococcosis in children. Pediatr Respir Rev 2009; 10: 166-71.
129. Simwami SP , Khayhan K, Henk DA ,Aanensen DM, Boekhout T. Low Diversity *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* multilocus secuency types from Thailand and consistent an ancestral African origin. PLoS Pathog 2011. Doi:10.1371/journal.ppat.1001343.
130. Sotolongo R. Manifestaciones nerviosas y pulmonares en el curso de la criptococosis; estudio de 6 casos ingresados en el Hosp. Doc. Gral. Calixto García durante los años 1964-1972. [Tesis de Especialista de Primer Grado en Medicina Interna]. Ciudad de La Habana, 1973.
131. Staib F. Samping and isolation of *C. neoformans* from indoor air with the aids of the Reuter centrifugal sampler (RCS) and *Guizotia abyssinica* creatine agar. A contibution to the mycological-epidemiological of *Cryptococcus neoformans* in the fecal matter of caged birds. Zentralbl Bakteriol Hyg 1985; 180: 567-75.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

132. Tay ST, Lim HC, Tajuddin TH, Rohani MY, Hamimah H, Determination of molecular types and genetic heterogeneity of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in Malaysia. *Med Mycol* 2006; 44: 617-22.
133. Tay ST, Na SL, Tajuddin TH. Natural occurrence and growth reaction on canavanine-glycine-bromothimol blue agar of non-*neoformans* *Cryptococcus* spp. in Malaysia. *Mycoses* 2008; 51: 515-9.
134. Teles F, Seixas J. The future of novel diagnostics in medical mycology. *J Med Microbiol* 2014; In press. Doi:10.1099/jmm.0.082297-0
135. Török E, Moran E, Cooke F. *Cryptococcus neoformans*. En: Oxford handbook of infectious diseases and microbiology. Oxford University Press, New York. 2010: p. 527-9.
136. Torres M. Criptococosis meningoencefálica: comparación clínica y de los hallazgos de laboratorio entre pacientes con sida y seronegativos al VIH. Estudio de la cinética de antígenos específicos [Tesis de Especialista de Primer Grado en Microbiología]. Ciudad de La Habana; IPK 2002.
137. Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *Braz J Infect Dis* 2013; 17: 353-62.
138. Vidotto V, Aoki S, Ponton J, Quindos G, Koga-Ito CY, Pugliese A. A new caffeic acid minimal synthetic medium for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 87-9.
139. Viviani MA, Esposto MC, Cogliati M, Montagna MT, Wickes BL. Isolation of a *Cryptococcus neoformans* serotype A *MATa* strain from the Italian environment. *Med Mycol* 2001; 39: 383-6.
140. WHO (World Health Organization) Guideline Development group. Rapid Advice: diagnosis, prevention and management of Cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services, 2011. ISBN 978 92 4 150297 9.
141. Yildiran ST, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG. In vitro susceptibilities of cerebrospinal fluid isolates of *Cryptococcus neoformans* collected during a ten-year period against fluconazole, voriconazole and posaconazole (SCH56592). *Mycoses* 2002; 45: 378-83.

## IX. Referencias Bibliográficas

---

142. Yuchong C, Jianghan C, Hai W, Julin G. Lumbar puncture drainage with intrathecal injection of amphotericin B for control of cryptococcal meningitis. *Mycoses* 2011; 54: e248-51.
143. Yugueros Y, Pincus DH. Fungal diagnosis: Review of commercially available methods. Louise O'Connor and Barry Glynn (eds.), *Fungal diagnostics: methods and protocols*. Doi: 10.1007/978-1-62703-257-5\_2, © Springer Science+Business Media New York; 2013.

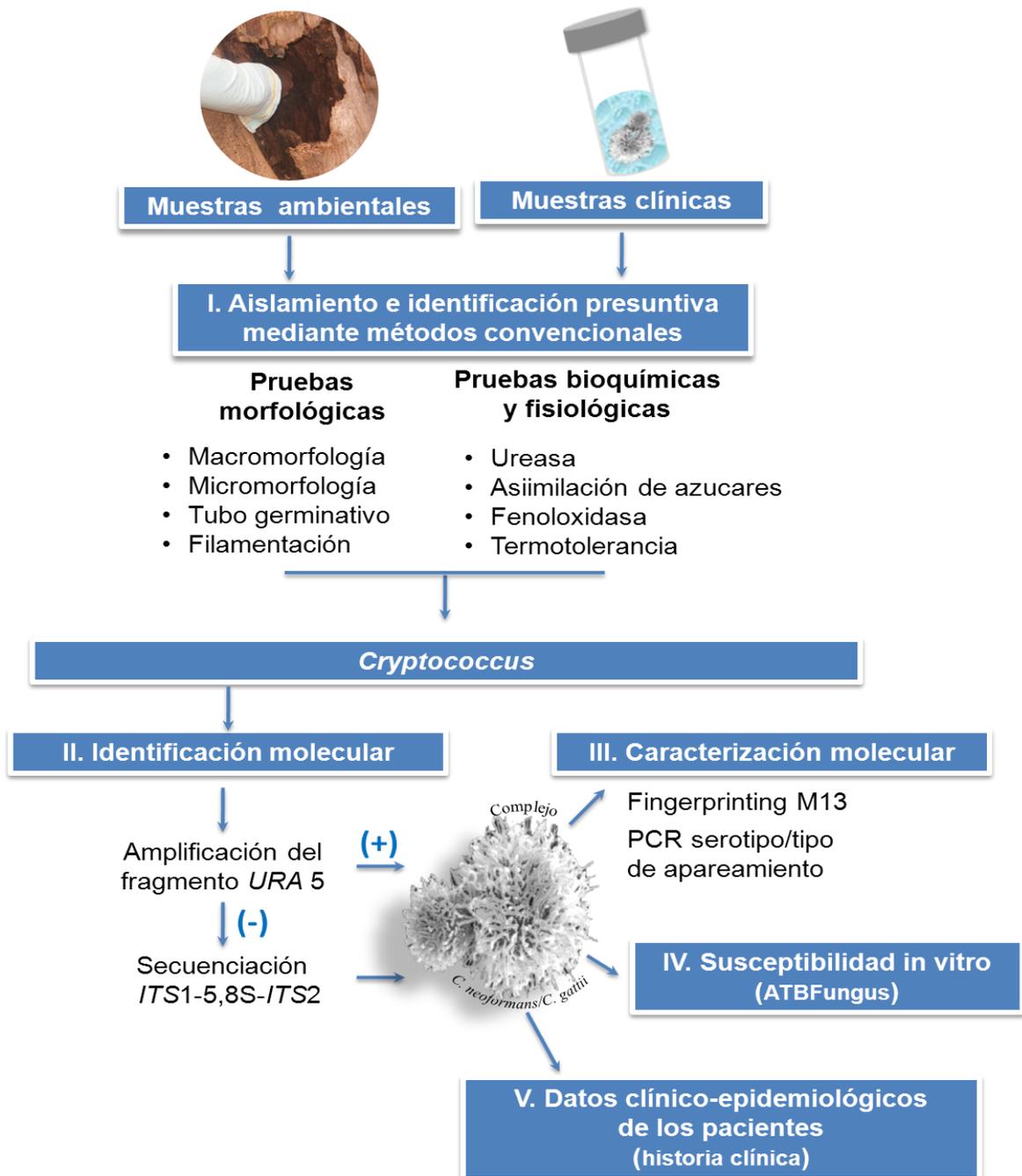
## IX. Referencias Bibliográficas

---

ANEXOS

## Anexo 1

## Flujograma de trabajo



## Anexo 2

## Relación de medios de cultivos empleados y su composición.

Componentes	Cantidad
<b>Agar dextrosa de Souraud (ADSS / ADSCI)</b> (Emmons).	
Disponible comercialmente (Becton Dickinson, bioMérieux, Fluka, Oxoid, Remel, BioCen)	
Glucosa	20 g
Peptona micológica	10 g
Agar	15 g
Agua destilada csp.	1000 mL
pH 6.8 ± 0.2	
Puede suplementarse con cloranfenicol	0.05 g
<b>Agar harina de maíz</b> (Emmons).	
Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Difco, Remel)	
Harina de maíz	40 g
Agar	20 g
Tween 80	3 mL
Agua destilada csp.	1000 mL
<b>Agar urea</b> (Christensen; 1946)	
Disponible comercialmente (Becton Dickinson, Biomedics, Difco, Fluka, Merck, Remel, Sigma)	
Peptona	1 g
Glucosa	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Dihidrógeno fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g
Solución de Rojo fenol al 0,2% en alcohol al 50%	12 mg
Solución acuosa de urea 20% esterilizada por filtración	100 mL
Agar	20 g
Agua	900 mL
pH 6.8	
<b>Agar extracto de carne</b>	
Disponible comercialmente (Becton Dickinson, bioMérieux, Fluka, Oxoid, Remel, BioCen)	
Extracto de carne	3 g
Peptona	1 mg
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Agar No. 3	1.5 g
Agua destilada csp.	100 mL
pH 7.6	

---



---

**Relación de medios de cultivos empleados y su composición.**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Agar ácido caféico</b> (Vidotto <i>et al.</i> , 2004)	
No disponible comercialmente	
Glucosa (inositol)	5 g
Acido caféico	0,18 g
Solución de citrato férrico	4 mL
Agar noble	20 g
Agua csp.	1000 mL
pH 6.8	
Solución de citrato férrico	
Citrato férrico ( $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )	0,01 g
Agua csp.	20 mL
<b>Agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB)</b>	
No disponible comercialmente	
Solución A	
Glicina	10 g
Dihidrógeno ortofosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1 g
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	1 g
Tiamina HCl	1 mg
Sulfato de L-canavanina	30 mg
Agua destilada csp.	100 mL
pH 5.6	
Solución B	
Azul bromotimol	0.4 g
Agua destilada	36 mL
Hidróxido de sodio (NaOH) 0.01N	64 mL
Solución B	
Agar	20 mL
Agua destilada csp.	20 g
Solución A filtrada	880 mL
	100 mL

### Anexo 3. Pruebas morfológicas empleadas en el estudio

- i) Examen microscópico directo (Koneman y Robert, 1987): A partir de una suspensión del cultivo en agua destilada estéril se realizó una preparación entre porta- y cubre- objetos y observó al microscopio óptico (20x y 40x) para determinar la morfología de la célula.

Interpretación de la prueba: Se consideró como sugestivo de *Cryptococcus* la presencia de levaduras redondeadas u ovoides de 2 - 6  $\mu\text{m}$  de diámetro con presencia o no de célula hija, ausencia de otras morfologías fúngicas.

- ii) Formación de tubos germinativos (McGinnis, 1980): Con un asa estéril se tomó un inóculo pequeño que fue transferido a un tubo con 3 mL de clara de huevo y se incubó a 37 °C durante 2 ½ a 3 h. Luego se colocó una gota entre porta- y cubre-objetos y se observó al microscopio óptico (20x y 40x) para descartar la presencia de tubos germinativos.

Interpretación de la prueba: Se tomó como criterio de positividad el desarrollo de filamentos con paredes paralelas, sin constricción en su punto de origen y longitud de 3 a 4 veces la de la célula madre.

- iii) Filamentación (Koneman y Robert, 1987): Con un asa estéril se inoculó la superficie del medio agar de harina maíz-tween 80 (anexo 2) mediante dos estrías paralelas de 2,5 cm de longitud a 1 cm de distancia entre sí. Posteriormente se flameó el asa y se realizaron estrías de iguales características perpendiculares a las primeras. Se colocó un cubreobjetos estéril y se incubó durante 72 h a 28 °C y se observó el cultivo directamente al microscopio óptico (20x).

Interpretación de la prueba: La prueba se consideró sugestiva de *Cryptococcus* spp., cuando se observó la presencia de blastosporas y se confirmó la ausencia de hifas, pseudohifas u otras morfologías.

### Anexo 4. Pruebas fisiológicas y bioquímicas

- i) Termotolerancia a 37 °C (Rippon, 1998): Con un asa estéril se inoculó la superficie de dos cuñas de ADSS y se incubaron de forma paralela a 37 °C y 28 °C (control de crecimiento) por 5 días.  
Interpretación de la prueba: Se evaluó la presencia de crecimiento (resistente) o no (sensible) en comparación con el tubo control.
- ii) Producción de ureasa (Koneman y Robert, 1987): Se transfirió una colonia de la levadura con un asa estéril a un plano inclinado de agar urea de Christensen (anexo 2), se incubó a 28 °C y se realizó lectura diaria hasta 5 días.  
Interpretación de la prueba: Se consideró como positiva (presencia de actividad enzimática) cuando se observó cambio de coloración de amarillo a rosado intenso en el tubo inoculado y negativa (ausencia de actividad enzimática) cuando no se observó modificación en el color original del medio.
- iii) Asimilación de carbohidratos (McGinnis, 1980): Previa re-siembra en agar extracto de carne carente de glucosa (anexo 2) e incubación a 37 °C por 7 días, se preparó una suspensión de la levadura en agua destilada estéril y se ajustó la turbidez a la escala 4 de McFarland. Luego, con hisopo estéril se sembró de forma homogénea en placa con medio basal de asimilación (anexo 2). Una vez seco el inóculo se colocaron los discos impregnados con fuentes de carbono (glucosa, galactosa, lactosa, inositol, maltosa, celobiosa, rafinosa, melibiosa, trehalosa, melizitosa y xilosa, cada uno). Las placas se incubaron hasta 72 h a 28 °C.  
Interpretación de la prueba: Se tomó como criterio de asimilación la presencia de halo de opacidad (crecimiento), alrededor de los discos de azúcares y como negativo la ausencia del mismo. Los patrones se interpretaron según las tablas de identificación del texto de referencia.

- iv) Producción de fenoloxidasa (Kwon-Chung *et al.*, 2011): Previa re-siembra en agar extracto de carne carente de glucosa (anexo 2) e incubación a 37 °C por 7 días, se transfirió una asada del crecimiento a una placa con medio agar ácido caféico (anexo 2). El cultivo se incubó a 28 °C hasta 5 días con la realización de lecturas diarias para detectar la presencia de colonias pigmentadas.  
Interpretación de la prueba: Se tomó como criterio de positividad la presencia de colonias color café independientemente de la intensidad del mismo.
- v) Crecimiento en agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (Kwon-Chung *et al.*, 1982): Los aislamientos en estudio se sembraron de forma independiente en placas con CGB (anexo 2) y se incubaron a 37 °C hasta 10 días con la realización de lecturas diarias para detectar el posible cambio de color en el medio de cultivo.  
Interpretación de la prueba: Se asumió como criterio de positividad (*C. gattii*) el cambio de color del indicador del amarillo al azul cobalto y negativo (*C. neoformans*) cuando no se observó modificación en el color original del medio.

## Anexo 5

Combinación de cebadores empleados tanto en la determinación del serotipo y tipo de apareamiento como en la secuenciación de los aislamientos estudiados.

<b>Alelo o domino</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia del cebador (5' - 3')</b>
<i>URA5</i>	ura5-f	ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG
	ura5-r	TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC
<i>STE20A<math>\alpha</math></i>	JOHE 7264	AGCTGATGCTGTGGATTGAATAC'
	JOHE 7265	GTTCAATTAATCTCACTACCTGTAG
<i>STE20Aa</i>	JOHE 7270	ATCAGAGACAGAGGAGGAGCAAGAC
	JOHE 7272	TCCACTGGCAACCCTGCGAG
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	M13	GAGGGTGGCGGTTCT

### Anexo 6

Breve descripción de la técnica para la determinación de la susceptibilidad a antifúngicos por el método coercial ATB™ Fungus 3 (bioMérieux, Marcy, l'Étoile, Francia) según las recomendaciones del fabricante.

1. En un tubo con 2 mL de NaCl al 0,9% preparar una suspensión de levaduras tomadas de un cultivo puro y fresco.
2. Ajustar la turbidez usando como referencia el patrón 2 de McFarland.
3. Transferir 20 µL de la suspensión anterior a una ampolla de ATB F2 *Mediume* inocular manualmente la galería a razón de 135 µL por cúpula (aproximadamente  $3 \times 10^4$  levaduras/mL ó  $4 \times 10^3$  levaduras/cúpula).
4. Colocar la tapa sobre la galería e incubar en cámara húmeda durante 24 h a 35°C. Pasado este tiempo, si el crecimiento en las cúpulas testigo es insuficiente, incubar otras 24 horas en las mismas condiciones. Si transcurridas las segundas 24 h continuó igual, la prueba se considera como no válida y debe repetirse.

## Anexo 7

## PLANILLA DE RECOGIDA DE DATOS

## DATOS GENERALES:

Nombre y apellidos:

HC No:

Sexo:

Edad:

Procedencia:

## DATOS CLÍNICOS DE INTERÉS:

Fecha de diagnóstico de la criptococosis:

Fecha de diagnóstico de VIH:

Antecedentes patológicos personales:

Otras infecciones fúngicas:

Tto previo con antifúngicos:

Antifúngico (dosis)	Fecha (duración del tto)

Síntomas y signos: fiebre\_\_, cefalea\_\_, náuseas/vómitos\_\_, fotofobia\_\_, alteraciones de la conciencia\_\_, signos meníngeos\_\_

Otros:

Tto anticriptococósico actual:

Antifúngico	Dosis	Fecha		Duración del tto
		Inicio	Terminación	

## DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO:

Prueba	Fecha	Resultado

## DATOS DE LABORATORIO CLÍNICO:

Citoquímico:

Fecha	Presión	Aspecto	Células	Proteína	Glucosa

Otros complementarios:

Estudios radiológicos:

## EVOLUCIÓN:

## OTROS DATOS DE INTERÉS:

## Anexo 8

## Aval Comisión de Etica de la Investigación, IPK.




**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURÍ"**  
Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO  
Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



INSTITUTO  
Pedro Kourí

**COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL**

**PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 39-14.**

**Aislamiento y caracterización de Cryptococcus a partir de fuentes naturales y clínicas.  
IPK 20133-2013**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL**

**Dra Yizy Rivera Castillo**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento,  
aprobado por los integrantes del Comité de Ética de la institución, emitimos el siguiente:

**DICTAMEN**

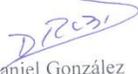
1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el documento presentado aparece que es necesaria la incorporación de cuatro nuevos sitios de investigación, y se describen sus provincias y correspondientes investigadores
3. Se aprueba la solicitud presentada

Dado, en el IPK, La Habana, a los 9 días del mes Septiembre del 2014

  
Dr Eric Martínez  
Presidente

  
Dr. Roberto Fernández

  
Lic. Iliana del C. Valdés  
Secretaria

  
Dr. Daniel González

  
Lic. Ana M. Montalvo Dr.C.

Teléfono (537) 202 0430 al 40 (pizarra) Teléfono (537) 202 0633; Fax: (537) 204 6051 Telex: 51 1902 CUIPK y 51 2341 CUIPK  
E-mail: ciipk@ipk.sld.cu, Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km. 6 ½, Ciudad Habana, Cuba, P.O. Box: 601 Marianao 13



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURÍ"**

Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO  
Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



**CERTIFICACIÓN DE SEGURIDAD**

El que firma certifica que todas las actividades de investigación de esta solicitud, que involucra humanos, fueron examinados y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", que se reunió en:

La Habana, Instituto Pedro Kourí, 9 días del mes de Septiembre de 2014

(lugar y fecha)

El Comité de Ética estuvo formado por los siguientes miembros:

Nombre y Apellidos	Profesión	Cargo actual/institución
Dr. Eric Martínez (Presidente) Dr.Cs	Médico	Invest. Titular/IPK
Sr Roberto Fernández	Médico	Invest. Auxiliar/ IPK
Dr. Daniel González Dr.C.	Médico	Inv. Aux. /IPK
Lic. Ana Margarita Montalvo Dr.C.	Lic. Biología	Invest. Auxiliar/IPK
Lic Iliana del Carmen Valdés M.Sc.	Lic. Microbiología	Investigador Auxiliar/IPK

Presidente del Comité de Ética Institucional

Dr. Eric Martínez

  
Firma

  
Fecha

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Anexo 9

**Aval de la Comisión Científica Especializada de Microbiología, IPK.**



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURÍ"**

Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO  
Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de vectores y huéspedes intermedarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias  
Para el estudio del Dengue y su vector



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK)

**AVAL DE LA COMISIÓN CIENTÍFICA  
ESPECIALIZADA DE MICROBIOLOGÍA**

Por este medio se hace constar que la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CCEM), como órgano asesor científico-técnico de la Vicedirección de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), ha aprobado el Protocolo de Tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología Micología titulado: **Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus* a partir de fuentes naturales y clínicas, IPK, 2011-13**, de la Dra. Yizy Rivera Gallego y que tiene como tutor a la DrC. María Teresa Illnait Zaragozí y asesor al DrC. Carlos Manuel Fernández Andreu.

Dr. Carlos M. Fernández Andreu  
Secretario CCEM, IPK



La Habana, 30 de julio de 2014