



Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Vicedirección de Microbiología
Departamento de Bacteriología-Micología

**Caracterización genotípica y
susceptibilidad a antifúngicos
de aislamientos cubanos de
Cryptococcus.**

Tesis en opción al grado de
Doctor en Ciencias Médicas

Dra. María Teresa Illnait Zaragoza

La Habana
2012

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

Vicedirección de Microbiología

Departamento de Bacteriología-Micología

Laboratorio de Micología

**CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS
DE AISLAMIENTOS CUBANOS DE *Cryptococcus*.**

Tesis en opción al grado científico de

Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. María Teresa Illnait Zaragozí, M. Sc

Tutor: Lic. Carlos Manuel Fernández Andreu, Dr. C.

Asesores: Dr. Gerardo Félix Martínez Machín

Dr. Jacobus Franciscus G.M. Meis, Dr. C.

La Habana

2012

A mis padres e hijos,
Responsables de mi existencia y del deseo de ser cada día mejor.

AGRADECIMIENTOS

La gratitud es el sentimiento más dulce que conmueve el alma
Máximo Gómez

Las páginas de agradecimientos superarían las del cuerpo de esta tesis si lograra mencionar todos los nombres de aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo. No obstante, hay nombres que no puedo dejar de mencionar:

A mis profesores, colegas y amigos Gerardo y Carlos, de quienes aprendí no solo micología. A ustedes va no solo mi eterno agradecimiento, también mi admiración y cariño.

A la familia de magníficos investigadores que desde el otro lado del Atlántico, aún sin conocerme, me abrió sus puertas, me dio la oportunidad de materializar este trabajo y me ha brindado todo tipo de apoyo. De forma muy especial a Jacques, Corné y Teun.

A mis más que amigas, hermanas Iliana, Dihadenys y Gilda, sin cuya ayuda incondicional y solidaridad, no solo durante la realización de este trabajo, sino en cada minuto del día a día, hubiese sido mucho más difícil la existencia.

A la otra parte de mi equipo: Mayda, Iraida y Ernesto; a ellos que han estado siempre presentes y los cuales me han ofrecido además, experiencia y juventud.

¿Y que fuera de mí sin Gato? Gracias René por estar, por compartir y por sacarme de cuanto apuros hay.

A las Dr. C. Mayra Muné, Virginia Capó y Rosmary Rodríguez, quienes a pesar de todos sus deberes aceptaron sin titubear cuando les pedí ayuda en la revisión del manuscrito. Gracias por sus aportes y sabios consejos.

A los Dr. C. Nidia Rojas y Raúl Díaz, cuyos oportunos señalamientos como oponentes durante el ejercicio de pre-defensa, contribuyeron al perfeccionamiento de este documento.

A los miembros del Departamento Bacteriología-Micología, en especial al Dr. Ernesto Montoro por su constante interés y apoyo en todo momento.

A la Dra. Nereyda Cantelar y su colectivo y en general a toda la familia IPKqueña que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

A la profesora de profesores, la Dra. Alina Llop y a nuestro inolvidable Dr. Profesor Gustavo Kourí, de quienes hemos aprendido además de amar a la ciencia, a la humanidad. En este punto me detengo a confesar, que me siento afortunada de haber tenido la oportunidad de coincidir de alguna manera en tiempo y espacio con ustedes.

A los que me han alentado, han sido cómplices y me han dicho ... tú puedes!!!, Gracias!!

La autora.

SÍNTESIS

Los datos sobre la susceptibilidad de los aislamientos cubanos de *Cryptococcus neoformans* eran escasos y no se contaba con herramientas de epidemiología molecular suficientemente discriminativas. Se estudiaron 134 aislamientos clínicos, 86 de excretas de palomas y 196 de plantas de diferentes especies. Se analizaron las tallas de fragmentos polimórficos obtenidos con enzimas de restricción, la secuencia de las regiones ITS1/5.8S/ITS2 y D1/D2, se determinó el tipo de apareamiento mediante reacción en cadena de la polimerasa y el análisis del número de repeticiones de fragmentos cortos (STR) para lo que se diseñaron nueve cebadores. Se determinó la susceptibilidad frente a anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol por microdilución en medio líquido. Fluconazol se evaluó además mediante Etest y disco. Todos los aislamientos clínicos y el 29,7% de los ambientales fueron identificados como *C. neoformans* Aα. No se evidenció resistencia entre los aislamientos clínicos y se demostró que los métodos de difusión en agar pudieran ser útiles para la pesquisa de resistencia al fluconazol. La tipificación mediante STR indica la presencia de nichos ecológicos hasta ahora no estudiados y la infección con múltiples genotipos como mecanismo de recurrencia; aspectos que modifican la concepción epidemiológica y patogénica de esta micosis.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

5FC	5-fluorocitosina
A	
AAC	Agar ácido caféico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ADS	Agar dextrosa de Sabouraud
AFLP, de sus siglas en inglés	Análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados
Anf B	Anfotericina B
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC, de sus siglas en inglés	Colección Estadounidense de Cultivos Tipos
B	
BLAST, de sus siglas en inglés	Herramienta para búsqueda local de alineación básica
C	
CBS, de sus siglas en neerlandés	Centro de Biodiversidad Fúngica
CGB	L-canavanina-glicina-azul de bromotimol
CIM	Concentración inhibitoria mínima

CIM ₅₀	Concentración mínima del antifúngico capaz de inhibir al 50 % del crecimiento de la cepa en comparación con el control de crecimiento
CIM ₉₀	Concentración mínima del antifúngico capaz de inhibir al 90 % del crecimiento de la cepa en comparación con el control de crecimiento
CLSI, de sus siglas en inglés	Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos
CM	Complejo de microsátélites
CWZ, de sus siglas en neerlandés	Hospital “Canisius-Wihelmina”
D	
dNTP	Desoxi(ribo)nucleótidotrifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	
EUCAST, de sus siglas en inglés	Comité Europeo para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
F	
Flu	Fluconazol
I	
Isa	Isavuconazol
Itr	Itraconazol
ITS, de sus siglas en inglés	Espaciadores internos de transcripción
L	
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMIPK	Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
M	
MLST, de sus siglas en inglés	Tipificación de secuencias multilocus

MOPS, de sus siglas en inglés	Ácido 3-N- morfolino propanosulfónico
N	
NCCLS, de sus siglas en inglés	Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos
P	
PCR, de sus siglas en inglés	Reacción en cadena de la polimerasa
Pos	Posaconazol
R	
RAPD-PCR	Amplificación al azar de ADN polimórfico mediante reacción en cadena de la polimerasa
RFLP, de sus siglas en inglés	Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
RPMI, de sus siglas en inglés	Instituto “Roswell Park Memorial”
S	
SNC	Sistema nervioso central
SSE	Solución salina estéril
STR, de sus siglas en inglés	Fragmentos cortos repetitivos
T	
TARVAE	Terapia antirretroviral altamente efectiva
U	
UPGMA, de sus siglas en inglés	Promedio de las variables no ponderadas
V	
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
Vor	Voriconazol

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Introducción	2
I.2. Hipótesis	6
I.3. Objetivos	6
I.4. Novedad científica	7
I.5. Valor Teórico	7
I.6. Valor Práctico	8
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
II.1. Desde el descubrimiento de los agentes causales de la criptococosis hasta su clasificación actual	10
II.2. Criptococosis	12
II.2.1 Concepto	12
II.2.2 Agente causal	13
II.2.3 Ecología del agente causal	14
II.2.4 Patogenia de la enfermedad	15
II.2.5 Manifestaciones clínicas	18
II.3. Diagnóstico y caracterización molecular	19
II.4. Manejo de los pacientes con criptococosis. Nuevas opciones terapéuticas	24
II.5. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i>	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
III.1. Tipo de estudio	31
III.2. Marco de la investigación	32

III.3.	Procedimientos de trabajo	32
III.3.1.	Material biológico	32
III.3.1.1.	Cepas controles	33
III.3.1.2.	Aislamientos clínicos	34
III.3.1.3	Aislamientos de material vegetal	34
III.3.1.4	Aislamientos de excretas de palomas	36
III.3.1.5	Obtención del material genético	36
III.3.2.	Investigaciones realizadas para dar respuesta a los objetivos propuestos	36
III.3.2.1.	Caracterización taxonómica hasta nivel de serotipo y tipo de apareamiento de los aislamientos cubanos de <i>Cryptococcus</i>	36
III.3.2.1.1.	AFLP	37
III.3.2.1.2.	Secuenciación nucleotídica de las regiones ITS1/5.8S/ITS2 y D1-D2 ..	38
III.3.2.1.3.	Determinación del serotipo y tipo de apareamiento	40
III.3.2.2.	Determinación de las posibles fuentes de infección por <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	41
III.3.2.3.	Caracterización de los aislamientos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> obtenidos de pacientes con meningitis recurrente	42
III.3.2.3.1.	Determinación de la susceptibilidad <i>in vitro</i>	43
III.3.2.3.2.	Determinación de los perfiles genotípicos	44
III.3.2.4.	Determinación de los patrones de susceptibilidad <i>in vitro</i> de los aislamientos cubanos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	45
III.3.2.4a.	Método de microdilución en medio líquido	45
III.3.2.4b.	Método de difusión mediante Etest	46
III.3.2.4c.	Método de difusión con discos	46
III.3.2.4.1	Análisis estadístico	47
III.4.	Consideraciones éticas	48

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
IV.1. Caracterización taxonómica hasta nivel de serotipo y tipo de apareamiento de los aislamientos cubanos de <i>Cryptococcus</i>	51
IV.1.1. Aislamiento e identificación presuntiva de <i>C. neoformans</i> a partir de las fuentes vegetales seleccionadas	51
IV.1.2. Caracterización mediante métodos moleculares	57
IV.1.3. Re-identificación de los aislamientos clínicos y de los obtenidos a partir de excretas de palomas. Determinación del serotipo/tipo de apareamiento	58
IV.2. Determinación de las posibles fuentes de infección por <i>Cryptococcus</i> a través de la comparación de los patrones genéticos de aislamientos clínicos y ambientales	63
IV.3. Susceptibilidad antifúngica y genotipificación de aislamientos consecutivos recuperados de pacientes con meningitis criptococósica recurrente	69
IV.4. Determinación de los patrones de susceptibilidad <i>in vitro</i> de los aislamientos cubanos de <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> frente a los antifúngicos de primera línea en el tratamiento de la criptococosis y otros azoles	75
IV.4.1. Determinación de los patrones de susceptibilidad <i>in vitro</i> mediante el método de microdilución en medio líquido	75
IV.4.2. Determinación de los patrones de susceptibilidad <i>in vitro</i> mediante los métodos de difusión en agar Etest y disco para fluconazol y su correlación con los resultados obtenidos por microdilución en medio líquido	80
DISCUSIÓN GENERAL	84
V. CONCLUSIONES	92
VI. RECOMENDACIONES	94
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS	97
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA	123
Relacionadas con el tema de la tesis	124
No relacionadas con el tema de la tesis	128

ANEXOS

- Anexo 1. Principales características de las especies pertenecientes al complejo *C. neoformans*
- Anexo 2. Clasificación taxonómica del complejo de especies *C. neoformans*
- Anexo 3. Características de los antifúngicos incluidos en el presente estudio
- Anexo 4. Descripción de los medios de cultivo
- Anexo 5. Representación esquemática de la preparación de la placa de microdilución para la determinación de las CIM mediante el método de referencia

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. Introducción

De acuerdo a la clasificación taxonómica actual, el género *Cryptococcus* incluye alrededor de 100 especies (Fonseca *et al.*, 2011); sin embargo, *Cryptococcus neoformans* es la que más se asocia a infecciones en humanos. Gracias a una mejor comprensión de su estructura genética, *C. neoformans* var. *gattii* y *C. neoformans* var. *neoformans* se promovieron al nivel de especie y los serotipos de este último al nivel de variedades, quedando constituido el complejo *C. neoformans* por *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D), *C. neoformans* ser. AD y *C. gattii* (ser. B y ser. C) (Bovers *et al.*, 2008a; Fonseca *et al.*, 2011; Kwon-Chung *et al.*, 2011). Además de estos, los estudios genéticos han identificado varios híbridos intra- e inter- variedades y especies, así como diferentes linajes filogenéticos que pudieran representar nuevas especies (Bovers *et al.*, 2008a; Bovers *et al.*, 2008b; Ngamskulrungronj *et al.*, 2009).

La incidencia de la criptococosis, una de las micosis más importantes a nivel mundial, considerada inicialmente rara, comenzó a aumentar con el inicio del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) en la década de 1980. Tras el advenimiento de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) desde mediados de 1990, su frecuencia comenzó a disminuir en los países desarrollados. No obstante, la meningitis criptococósica aún constituye una de las micosis oportunistas potencialmente mortal más común en estos individuos (Park *et al.*, 2009). Adicionalmente, se reporta que hasta el 6 % de las personas con deterioro de la función de la inmunidad celular debido a otras causas, se encuentran en

riesgo de desarrollar una infección clínica evidente por este basidiomiceto (Levitz y Boekhout, 2006).

A pesar de que probablemente miles de personas se infectan cada año, el desarrollo inaparente de la infección imposibilita determinar su incidencia en la población general. Aún así, en individuos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), los estimados mundiales indican una incidencia de más de 1 000 000 de casos anuales que dejan a su paso al menos 625 000 fallecidos (Kronstad *et al.*, 2011). En el Caribe se reportan aproximadamente 7 800 casos y 4 300 fallecidos cada año, por lo que la enfermedad parece ser menos frecuente (Park *et al.*, 2009).

En Cuba, el primer caso de criptococosis se describió a mediados del siglo XX y a partir de entonces se comenzaron a reportar casos esporádicos asociados al alcoholismo, trasplantes de órganos y trastornos inmunológicos (Curbelo, 1951). Desde 1986, con el inicio del diagnóstico del sida, el número de individuos infectados por este hongo ha aumentado a través de los años. En el laboratorio de micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LMIPK) se diagnostican entre 8 y 20 casos al año (Illnait *et al.*, 2001a), mientras que el análisis de una serie de 211 autopsias practicadas a pacientes con VIH/sida, reveló la presencia de criptococosis en 27 de los fallecidos (más del 29 %), lo que demostró que este es un trastorno más grave y común que lo reportado anteriormente (Arteaga *et al.*, 1998). Hasta la fecha, todos los aislamientos clínicos en Cuba identificados, pertenecen a *C. neoformans* ser. A (Fernández *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1998a; Martínez *et al.*, 2004).

Su forma clínica de presentación más frecuente, la neurocriptococosis, se considera como marcadora del sida y la micosis de mayor letalidad en este grupo de personas. Los reportes reflejan una mortalidad del 60 % con un tiempo de vida medio de 14 días a pesar del tratamiento antifúngico convencional, cifra que alcanza el 100 % en los pacientes no tratados o con tratamientos iniciados tardíamente (Perfect *et al.*, 2010; Török *et al.*, 2010).

En general, los individuos que sobreviven al episodio inicial de infección, tienen alta tendencia a presentar recaídas a pesar de la implementación de las medidas recomendadas (Perfect *et al.*, 2010; Török *et al.*, 2010). El análisis comparativo de las caracterizaciones

moleculares dió lugar a la hipótesis sobre el origen de la criptococosis recurrente debido a la persistencia de la cepa inicial (Casadevall *et al.*, 1993; Spitzer *et al.*, 1993; Pfaller *et al.*, 1998; Desnos-Ollivier *et al.*, 2010), condición hasta ahora no explorada en los pacientes cubanos.

En la actualidad, los antifúngicos disponibles para su tratamiento se limitan a la anfotericina B, la 5-fluorocitosina y el fluconazol. Aunque los efectos secundarios asociados a la administración de los dos primeros pudieran restringir su uso, estos continúan siendo los agentes de elección para la terapia de inducción, mientras que el fluconazol demostró resultados superiores en la de mantenimiento a largo plazo (Schwarz, *et al.*, 2007; Perfect *et al.*, 2010; Török *et al.*, 2010).

Nuevas generaciones de azoles con potente actividad, amplio espectro de acción y perfiles farmacocinéticos satisfactorios, han surgido en los últimos años; no obstante, la industria farmacéutica continúa la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas con vistas a lograr productos cada vez más efectivos e inocuos. Con estos antecedentes se iniciaron los estudios de susceptibilidad frente al isavuconazol, antifúngico con actividad *in vitro* frente a los principales hongos patógenos y oportunistas (Odds, 2006; Schmitt-Hoffmann *et al.*, 2006a; Schmitt-Hoffmann *et al.*, 2006b; Sabatelli *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2007). No obstante, hasta el momento de la realización del presente estudio, se desconocía su eficacia frente *C. neoformans*.

Paralelamente, la comprensión de la ecología del complejo *C. neoformans*, así como la epidemiología y patogenia de la micosis causada por estas especies, continúa siendo un reto y un elemento esencial para el desarrollo de estrategias en el manejo y prevención de la infección en los individuos susceptibles. En este sentido, se han aplicado múltiples métodos de tipificación molecular con los cuales se han obtenido resultados divergentes. Hasta la fecha, los más frecuentemente utilizados incluyen a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) específica para la determinación de serotipos y tipos de apareamiento, el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, de sus siglas en inglés), el PCR-fingerprinting, la amplificación al azar mediante reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico (RAPD-PCR, de sus siglas en inglés) y el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

(RFLP, de sus siglas en inglés) entre otras (Boekhout *et al.*, 2001; Escandón *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2003; Trilles *et al.*, 2003; Viviani *et al.*, 2006; Raimondi *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008; Hagen *et al.*, 2010a). Más recientemente, la tipificación de secuencias multilocus (MLST, de sus siglas en inglés) fue aplicada a colecciones de *C. neoformans* y *C. gattii* de diversos orígenes con buenos resultados; sin embargo, esta es una técnica laboriosa, alta consumidora de tiempo y asociada a costos elevados (Bovers *et al.*, 2008a; Bovers *et al.*, 2008b; Litvintseva *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2009). Al igual que en esta última, en la tipificación con fragmentos cortos altamente repetitivos (STR, de sus siglas en inglés), los resultados se expresan numéricamente, por lo que son mucho más compactos (factibles de transportar en dispositivos electrónicos intercambiables) y fáciles de comparar con los obtenidos en otros laboratorios. La tipificación mediante STR cuenta con la ventaja adicional de ser más discriminatoria y de proporcionar una caracterización genética rentable en corto tiempo, por lo que su uso se hace cada vez más frecuente (de Valk *et al.*, 2009; Klaassen, 2009).

Desde finales de la década de 1980, con el incremento del número de pacientes con criptococosis en Cuba, esta temática pasó a formar parte de las líneas prioritarias de trabajo del LMIPK. En torno a esta micosis y su agente causal, se realizaron estudios con diferentes aristas entre los que se encuentran: de identificación y caracterización de aislamientos empleando los métodos convencionales disponibles en cada momento (Fernández *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1998a; Martínez *et al.*, 2004), de epidemiología (Martínez *et al.*, 1992; Brito, 2000; Fernández, 2001; Rabelo 2002), patogenia (Ilnait *et al.*, 2004), sobre el desarrollo de métodos de diagnóstico rápido (Álvarez *et al.*, 1992; Ilnait *et al.*, 2001b), la obtención de anticuerpos monoclonales anti-*C. neoformans* ser. A (Gato *et al.*, 2006; Ilnait *et al.*, 2011a), de correlación entre los hallazgos clínicos y de laboratorio en pacientes sero- negativos y positivos al VIH (Torres, 2002), así como de susceptibilidad a antifúngicos (Fernández *et al.*, 1998b; Fernández *et al.*, 1999) entre los más importantes. No obstante, estos últimos estuvieron restringidos a no más de 43 aislamientos y solo se evaluaron la anfotericina B y el fluconazol debido a la no disponibilidad de otros antimicóticos. De otra parte, se carecía de los recursos necesarios para el desarrollo de

técnicas moleculares, por lo que se desconocían los patrones genéticos de los aislamientos cubanos.

Sobre esta base, se planteó la siguiente investigación encaminada a determinar la relación genética entre los aislamientos cubanos de *C. neoformans* de origen clínico y ambiental, así como la susceptibilidad frente a la anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol y tres de los triazoles de reciente generación (voriconazol, posaconazol e isavuconazol), datos que pudieran contribuir a un mejor conocimiento sobre la epidemiología y patogenia de esta micosis en Cuba.

I.2. Hipótesis

Los aislamientos clínicos y ambientales cubanos del género *Cryptococcus* poseen diversidad genética y resistencia a los antifúngicos.

I.3. Objetivos

Objetivo general

- Caracterizar taxonómicamente los aislamientos clínicos y ambientales cubanos de *Cryptococcus* así como determinar sus patrones genotípicos y de susceptibilidad a los antifúngicos.

Objetivos específicos

- Determinar la especie, variedad, serotipo y tipo de apareamiento de los aislamientos de *Cryptococcus*.
- Comparar los patrones genéticos de aislamientos clínicos con los ambientales de *C. neoformans* var. *grubii* con vistas a determinar la relación entre los mismos y las posibles fuentes de infección humana.
- Caracterizar aislamientos consecutivos de *C. neoformans* var. *grubii* obtenidos de pacientes con meningitis recurrente.

- Comparar los patrones de susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii* frente a los antifúngicos empleados en la primera línea de tratamiento de la infección criptocócica y otros azoles de reciente generación.

I.4. Novedad científica

- Este es el estudio más amplio de susceptibilidad antifúngica de aislamientos cubanos de *C. neoformans* y es además el primero a nivel mundial donde se comparan los valores de concentración inhibitoria mínima de una amplia gama de antifúngicos frente a una representación importante de aislamientos colectados durante 25 años.
- Se reporta por primera vez la susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans* var. *grubii* frente al isavuconazol.
- Se diseñó un panel de nueve cebadores, siendo los pioneros en su aplicación como técnica de caracterización molecular en esta levadura.
- El estudio de la diversidad genética y de los patrones de susceptibilidad en aislamientos seriados de *C. neoformans* de pacientes con cuadros recurrentes no tiene precedentes en Cuba.
- Se determinó por primera vez en Cuba el serotipo/tipo de apareamiento de los aislamientos autóctonos del complejo *C. neoformans*.

I.5. Valor teórico

- Se demuestra por primera vez la prevalencia de *C. neoformans* var. *grubii* MAT α en los aislamientos estudiados.
- Se brindan nuevos conocimientos sobre la patogenia y epidemiología de la criptocosis y su agente causal para Cuba con implicaciones más allá de sus fronteras que se derivan de las siguientes observaciones:

- » La segregación genética observada entre los aislamientos clínicos y ambientales, sugiere la presencia de nichos de *C. neoformans* var. *grubii* adicionales hasta ahora no estudiados.
- » La recurrencia o persistencia de la infección criptocócica es causada mayormente por la co-infección con diferentes genotipos.

I.6. Valor práctico

- Uno de los objetivos priorizados por el Sistema de Salud Cubano es la vigilancia epidemiológica y la prevención, por lo que los conocimientos adquiridos con este trabajo se revertirán en impacto social al permitir re-evaluar estrategias en la prevención de la enfermedad y el manejo de los pacientes afectados.
- Los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad podrían contribuir a trazar pautas en el tratamiento de esta micosis en nuestro medio y a nivel mundial con la consiguiente disminución de mortalidad por esta infección, mejora en la calidad de vida de los pacientes así como ahorro de recursos por concepto de estadías hospitalarias y adquisición de medicamentos costosos y de menor efectividad.
- Las múltiples ventajas de la caracterización mediante STR (genotipado rentable en corto tiempo, menor laboriosidad, resultados transportables e intercambiables), sumado al elevado poder discriminatorio el cual quedó demostrado durante la realización de este trabajo, la hacen una técnica de gran utilidad para los estudios epidemiológicos de criptococosis y su agente causal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El complejo *C. neoformans* fue dado a conocer como patógeno humano hace poco más de un siglo. Debido a su amplia distribución y al número creciente de individuos afectados por este agente, la infección que causa se ha convertido en un gran reto para la medicina moderna a nivel mundial. Aquí se pretende brindar un acercamiento a los aspectos más sobresalientes del complejo *C. neoformans* y la enfermedad que ocasiona en relación con las temáticas abordadas en el presente trabajo.

II.1 Desde el descubrimiento del agente causal de la criptococosis hasta su clasificación actual

Aunque posiblemente la descripción del primer caso de criptococosis date de 1861 por Zenker, la ausencia de evidencias microbiológicas, hizo atribuirle este crédito a los médicos alemanes Otto Busse y Abraham Buschke. En 1894 ellos reportaron el aislamiento de un microorganismo al que denominaron *Saccharomyces hominis* a partir de una lesión en la tibia de una mujer de 31 años. Casi simultáneamente, Sanfelice describió la presencia de una levadura capsulada obtenida a partir de jugo de durazno fermentado; posteriormente demostró su patogenicidad en animales de laboratorio y la denominó *Saccharomyces neoformans*. El propio Sanfelice poco tiempo después, recobra un agente similar a partir del nódulo linfático de un buey y lo denomina *Saccharomyces lithogenes* debido a que este presentaba algunas diferencias respecto al primero (Casadevall y Perfect, 1998, Bovers *et al.*, 2008a).

Un año más tarde del primer reporte de un caso de criptococosis por Busse y Buschke, Ferdinand Curtis en Francia, describe un “parásito vegetal” levaduriforme como agente etiológico de un absceso ulcerado en un joven francés con antecedentes de salud. Basado en las diferencias morfológicas con los anteriores (levaduras ovals o elongadas) y la demostración en modelos animales de su afinidad por el tejido subcutáneo, Curtis denominó a este agente *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*. Debido a la ausencia de datos epidemiológicos, se desconoce si este caso, actualmente considerado como el primer reporte de infección por *C. gattii*, constituyó la primera infección autóctona en Francia (Kwon-Chung *et al.*, 2011).

Estos hallazgos evidenciaron tres aspectos cardinales: i) la capacidad de producir infección tanto en humanos como en animales, ii) esto sumado a la demostración de los postulados de Koch por Sanfelice y Curtis evidenciaron su potencial patogénico y iii) el hecho de ser recobrado a partir de fuentes naturales revelaba su naturaleza saprofita. No obstante, las diversas denominaciones recibidas causaron gran confusión respecto a este agente (Casadevall y Perfect, 1998; Bovers *et al.*, 2008a).

El género *Cryptococcus* se estableció por primera vez en 1833 por Kutzing para “acomodar” a un nuevo organismo descrito como “organismo microscópico globoso hialino que da lugar a colonias mucoides blanquecinas con posición taxonómica indeterminada”. Luego, en 1901, Vullemin consideró que aquellos microorganismos aislados por Busse y Sanfelice en 1894 deberían pertenecer a este género. A partir de entonces, su definición sufrió múltiples enmiendas hasta que se propuso conservar el nombre del género como *Cryptococcus* Vullemin y se designó a *C. neoformans* como especie tipo. Actualmente el género incluye cerca de 100 especies, tanto patógenas como no patógenas, para algunas de las cuales se conoce su estado teleomórfico (Tomado de Kwon-Chung *et al.*, 2011).

Un paso que contribuyó de manera significativa a la clasificación actual, fue el reconocimiento de la forma sexual de *C. neoformans*. En 1975 se describió el primer teleomorfo, *Filobasidiella neoformans*, el cual se obtuvo por el apareamiento de aislamientos compatibles de los serotipos A y D. La segunda especie, *Filobasidiella bacillispora*, se logró

por el entrecruzamiento de células compatibles de los serotipos B y C (Kwon-Chung, 1975). La correlación entre los serotipos y los diferentes estados teleomórficos indicaba que las diferencias entre los aislamientos no estaban limitadas a sus propiedades antigénicas. Los estudios subsecuentes demostraron que ambas especies se distinguen en cuanto a sus nichos ecológicos, epidemiología, bioquímica, asociación con diferentes estados inmunológicos del hospedador, filogenia y arreglos genómicos entre otros (anexo 1) (Kwon-Chung y Varma, 2006).

Las investigaciones en torno a los más diversos aspectos relacionados con este agente y la enfermedad que produce, dieron lugar a su clasificación actual. Lo que otrora se consideró una “especie compleja”, hoy se reconoce como un “complejo de especies” (Fonseca *et al.*, 2011). El estado anamorfo de *F. bacillisporea*, el cual comprende a los serotipos B y C se elevó al nivel superior y se nombró *Cryptococcus bacillisporus*; más tarde esta denominación se sustituyó por *C. neoformans* var. *gattii* y actualmente es reconocida como especie *C. gattii*. Por su parte, el anamorfo de *F. neoformans* (ser. A, D y AD), nombrado como *C. neoformans*, se reclasificó como *C. neoformans* var. *neoformans*; sin embargo, basado en sus características filogenéticas, esta nomenclatura también se modificó. Hoy esta última variedad, fue elevada a nivel de especie a la cual se le asignaron las variedades *C. neoformans* var. *grubii* correspondiente al serotipo A, *C. neoformans* var. *neoformans* correspondiente al serotipo D así como el estado intervarietal *C. neoformans* serotipo AD (anexo 2) (Kwon-Chung *et al.*, 2006; Kwon-Chung *et al.*, 2011).

II.2. Criptococosis

II.2.1. Concepto

La criptococosis, conocida anteriormente como enfermedad de Busse y Buschke, blastomicosis europea o torulosis es la infección producida por las levaduras encapsuladas del complejo de especies *C. neoformans*; microorganismos ubicuos capaces de causar enfermedad tanto a humanos como a animales. Aunque la infección ocurre a partir de la inhalación de partículas infecciosas, las formas clínicas más frecuentemente diagnosticadas no son las pulmonares, sino la meningitis y la diseminada (Kwon-Chung *et al.*, 2011).

II.2.2. Agente causal

De las cerca de 100 especies descritas comprendidas en el género *Cryptococcus*, el complejo *C. neoformans* constituye el principal responsable de las infecciones tanto en humanos como en animales (Fonseca *et al.*, 2011). No obstante, la literatura recoge un número cada vez mayor de reportes de casos por *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurenti*, como responsables aproximadamente el 80 % de las infecciones causadas por otras especies diferentes del complejo *C. neoformans* (Khawcharoenporn *et al.*, 2007). Otros miembros de este género se reportan con menor frecuencia y se encuentran relacionadas fundamentalmente con la inmunodepresión severa como principal factor predisponente. Resulta razonable suponer que con el incremento en la aplicación de regímenes de tratamiento agresivos que conllevan a estados de inmunosupresión graves o prolongadas, así como el desarrollo de los sistemas microbiológicos de identificación cada vez más sensibles y específicos, se produzca un incremento simultáneo en el número de aislamiento de los mismos (Casadevall y Perfect, 1998; Khawcharoenporn *et al.*, 2007; Kwon-Chung *et al.*, 2011). La identificación correcta de estos agentes tiene gran relevancia clínica, ya que los mismos muestran diferente susceptibilidad a los antifúngicos, lo que conlleva cambios en la conducta terapéutica (Pfaller *et al.*, 2009). No obstante, con fines prácticos, se considera que el complejo *C. neoformans* es el único que consistentemente produce esta enfermedad (Kwon-Chung *et al.*, 2011).

Las levaduras pertenecientes al complejo *C. neoformans* se caracterizan por ser redondeadas-ovaladas de 4 a 6 μm de diámetro, rodeadas de una cápsula polisacáridica de tamaño variable. Los aislamientos recobrados de fuentes ambientales, suelen ser pequeños ($\leq 4 \mu\text{m}$) con cápsula prácticamente inaparente mientras que en los de origen clínico sucede lo contrario ($\geq 30 \mu\text{m}$) (Casadevall y Perfect, 1998; Kronstad *et al.*, 2011). Basado en las diferencias antigénicas de esta estructura, se identificaron cinco serotipos: A, B, C, D y AD en tanto que las características bioquímicas, ecológicas, epidemiológicas y genéticas permitieron distinguir las actuales especies y variedades que integran el complejo (anexo 1).

II.2.3. Ecología del agente causal

El complejo *C. neoformans* está integrado por levaduras saprofitas de vida libre capaces de sobrevivir en diversos nichos ecológicos. Desde su descubrimiento hasta la actualidad, se han realizado numerosas investigaciones con vistas a lograr una mayor comprensión de su ciclo biológico en la naturaleza (Casadevall y Perfect, 1998; Randhawa *et al.*, 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2011).

La especie *C. neoformans* se aísla en todas las latitudes a partir de las más disímiles fuentes naturales (del suelo, el aire, el agua, de la leche cruda y sus derivados, frutas cítricas, de las 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*), siendo este entre los conocidos, su nicho ecológico más importante (Casadevall y Perfect, 1998; Cabral, 1999; Kwon-Chung *et al.*, 2011). A pesar de esto, las evidencias sugieren que las palomas no son su principal reservorio en la naturaleza, debido a las bajas concentraciones del microorganismo detectadas en el pico, el buche, las patas y el intestino de estas aves. Este fenómeno posiblemente se debe a la elevada temperatura corporal (41-43 °C) y las altas concentraciones de amonio presente en las excretas frescas que inhiben la multiplicación del agente. En contraste, en las heces acumuladas y protegidas de los rayos ultravioletas del sol, se pueden detectar concentraciones de hasta $2-3 \times 10^6$ células/g de heces, donde es capaz de sobrevivir hasta un año si se renueva la fuente de nitrógeno (Hamasha *et al.*, 2004). Estos hechos sumados a los reportes cada vez más frecuentes de *C. neoformans* a partir de más de 22 especies de árboles de diferentes familias y géneros hacen suponer que su nicho ecológico primario pudieran ser las plantas (Lazera *et al.*, 2000; Randhawa *et al.*, 2008; Randhawa *et al.*, 2010). Esta hipótesis está respaldada por la demostración de la especialización del complejo *C. neoformans* en la degradación de lignina que le sirve de sustrato para el crecimiento saprofito valiéndose de su enzima fenoloxidasa (Lazera *et al.*, 2000).

Por su parte, la especie *C. gatti* parece presentar una distribución más restringida a climas tropicales y subtropicales aunque más recientemente el brote ocurrido en la costa oeste de

América del Norte indica un cambio drástico en la adaptación de este microorganismo a otros ambientes (Kidd *et al.*, 2007; Galanis y Macdougall, 2010; Macdougall *et al.*, 2011). Su nicho ecológico 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 la consecuente diseminación de los propágulos al ambiente (Ellis y Pfeiffer, 1990). 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). Reportes posteriores de su aislamiento a partir de guano de murciélago, en Brasil y de un nido de avispa, en Uruguay, contribuyeron al mejor conocimiento de la diversidad de sus fuentes naturales que, curiosamente, no incluyen excretas de aves o suelos contaminados (Ellis, 1987; Hamasha *et al.*, 2004).

II.2.4. Patogenia de la enfermedad

Testimonios circunstanciales sugieren que la infección por las levaduras del complejo *C. neoformans* generalmente se desarrolla después de la inhalación de propágulos infecciosos. Esta también puede ocurrir en diversas especies de animales pero las evidencias de transmisión tanto de persona a persona como de los animales al hombre o de enfermedad adquirida en el laboratorio, son escasas. Otras rutas son menos frecuentes e incluyen el trasplante de órganos a partir de donantes infectados y la inoculación cutánea a través de traumatismos (Török *et al.*, 2010).

Los estudios serológicos en la población general indican una alta prevalencia de infección por estas levaduras, la cual parece ser adquirida durante la infancia. A pesar de esto, no todos los individuos desarrollan la enfermedad ya que este proceso suele estar determinado por tres factores fundamentales: el estado de los mecanismos de defensa del hospedador, la virulencia de la cepa infectante y la cuantía del inóculo (Casadevall, 2010).

Una vez inhalado el agente infeccioso, este llega a los pulmones, donde encuentra una primera línea de células efectoras fagocíticas inespecíficas: macrófagos alveolares, neutrófilos, células asesinas naturales y algunos linfocitos. La capacidad de estas células de eliminar las levaduras

es limitada, por lo que inóculos grandes pueden superarla y permitir la multiplicación del hongo. No obstante, los macrófagos que fagocitaron levaduras procesan los antígenos para expresarlos en su superficie unidos al complejo mayor de histocompatibilidad clase II y los presentan a los linfocitos T CD4⁺ encargados de desencadenar la respuesta inmune específica. En la mayoría de los sujetos inmunocompetentes, dicha respuesta es capaz de eliminar el microorganismo y la infección no pasa de un foco pulmonar localizado con pocos o ningún síntoma (Casadevall *et al.*, 1993; Olszewski *et al.*, 2010).

El desarrollo de la criptococosis es más frecuente en individuos con trastornos de la inmunidad mediada por células y en la actualidad la infección con el VIH, resulta la condición predisponente más importante (Byrnes *et al.*, 2009; Galanis y Macdougall, 2010). Otras circunstancias tales como: los tratamientos con esteroides, los pacientes que reciben trasplantes de órganos sólidos, las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, la diabetes, el linfoma, la leucemia, la sarcoidosis, la cirrosis, las enfermedades del tejido conectivo (Ej. lupus eritematoso y artritis reumatoide) las cuales a su vez son agravadas por el uso de esteroides, pudieran también favorecerla (Perfect, 2006). No obstante, la hipótesis de que un sistema inmune conservado es capaz de controlar la infección, ha sido desafiada. De un lado, los casos documentados desde antes de la epidemia del sida, demuestran que este agente es capaz de causar enfermedad en individuos sin causas predisponentes aparentes (Mitchell y Perfect, 1995) y de otro, se demostró ampliamente que la especie *C. gattii*, constituye la principal responsable de los cuadros de criptococosis en pacientes seronegativos al VIH (Casadevall, 2010).

A diferencia de las potentes toxinas liberadas por las bacterias patógenas, el complejo *C. neoformans* no parece producir abundantes productos que contribuyan directamente a la manifestación de la enfermedad. La participación de los mismos es sutil y en muchos casos favorecen la supervivencia de la levadura en el hospedador. La patogenia de la infección criptococósica depende en gran medida del balance entre la acción simultánea de varios de estos mecanismos y el estado del sistema inmune (Casadevall *et al.*, 2003; Idnurm *et al.*, 2005; Kozubowski y Heitman, 2011).

Entre los atributos más estudiados del complejo *C. neoformans* que contribuyen a la producción de enfermedad se encuentran la cápsula polisacáridica y sus constituyentes, la síntesis de melanina y la síntesis de enzimas extracelulares (ureasa, superóxidodismutasa,

proteinasas, esterasas y lipasas) (Rodríguez *et al.*, 2009; Zaragoza *et al.*, 2009; Kronstad *et al.*, 2011). 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 (Martínez *et al.*, 2008; Lin, 2009; Casadevall, 2010; Kozubowski y Heitman, 2011; Kronstad *et al.*, 2011).

Tanto *C. neoformans* como *C. gattii* comparten los principales mecanismos de adaptación y virulencia, lo que sustenta la clasificación de ambas especies como patógenas verdaderas. No obstante, la diferencia en la preferencia de hospedador resulta sorprendente y hasta el momento se desconocen sus bases, lo que indica la necesidad de estudios más profundos (Casadevall, 2010; Kozubowski y Heitman, 2011; Kronstad *et al.*, 2011).

La diseminación extrapulmonar se encuentra invariablemente asociada a enfermedad, siendo la meningoencefalitis la presentación clínica más frecuente. Las bases del neurotropismo del complejo *C. neoformans* no están muy claras, pero pudieran involucrar de un lado la abundante presencia de catecolaminas, las cuales constituyen excelentes sustratos para la enzima fenoloxidasa y de otro, la evasión selectiva de las defensas del hospedador. La barrera hematoencefálica excluye, de forma efectiva, las moléculas de proteínas como anticuerpos y factores del complemento, los cuales son esenciales para una opsonización eficiente del hongo. Se plantea que las células fagocíticas residentes del sistema nervioso central (SNC) son efectivas contra el hongo, pero su actividad depende de forma crítica de la presencia de opsoninas (Feldmesser *et al.*, 2000; Casadevall, 2010; Charlier *et al.*, 2010).

Ambas, *C. neoformans* y *C. gattii*, son capaces de sobrevivir en el ambiente inhóspito de los fagosomas. El desarrollo de estas estructuras con grandes masas de levaduras en su interior sugiere que los primeros estadios de la replicación del microorganismo, ocurren dentro de estas vesículas para luego escapar a través de un proceso de expulsión no destructivo (Johnston y May, 2010). En realidad dicha expulsión es precedida de la fusión fagolisosoma, la cual parece estar coordinada o ser dependiente del patógeno, ya que la misma no se produce en presencia de levaduras muertas (Álvarez y Casadevall, 2006).

La observación de fagolisosomas gigantes dio lugar a especular que *C. neoformans* es capaz de alterar las propiedades de la membrana de estos organelos citoplasmáticos lo que permite al patógeno evitar la muerte de la célula hospedadora y con esto la activación del proceso inflamatorio. De otra parte, se demostró la transferencia de levaduras entre macrófagos, proceso que pudiera contribuir a la persistencia o latencia del patógeno en el hospedador (Ma *et al.*, 2007; Johnston y May, 2010).

Se han realizado numerosos estudios para tratar de comprender los mecanismos de persistencia de *Cryptococcus*. En este sentido, los trabajos de Olszewski *et al.*, brindaron una amplia panorámica sobre este fenómeno tan complejo. Según estos investigadores, un pequeño número de levaduras pueden persistir por largos períodos e incluso de por vida en los tejidos del hospedador. En este caso, los efectos moduladores sobre la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, la elevada capacidad de adaptación a condiciones extremas, así como el desarrollo de la capacidad de adaptación y resistencia a los tratamientos, aunque resultan insuficientes para promover la enfermedad en la mayoría de los hospedadores inmunocompetentes, favorecen la persistencia subclínica y la reactivación de la infección o recaídas (Olszewski *et al.*, 2010).

II.2.5. Manifestaciones clínicas

Aunque el número de levaduras presentes en los sitios afectados es significativamente mayor en los pacientes inmunocomprometidos, las manifestaciones clínicas son similares tanto en estos como en los inmunocompetentes. Las infecciones por *C. gattii* a su vez pudieran distinguirse por su mayor tendencia a producir lesiones tumorales, 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 (Richardson, 2003; Török *et al.*, 2010).

La literatura recoge un sinnúmero de revisiones acerca de la criptococosis tanto en la era pre-sida como después de iniciada esta pandemia. En los más de 100 años de experiencia clínica, quedó establecido que el pulmón constituye el primer órgano de choque del complejo *C. neoformans*; sin embargo, la mayoría de los casos cursa de forma asintomática durante el

paso de esta levadura por el sistema respiratorio. Cuando aparecen manifestaciones, estas incluyen tos con expectoración mucoide, fiebre, dolor pleural, malestar general y pérdida de peso. A diferencia de la infección por *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* produce calcificación en los tejidos de forma excepcional, por lo que las lesiones no pueden ser detectadas radiológicamente; esta característica, combinada a la no disponibilidad de pruebas intradérmicas de utilidad, hacen más difícil la definición de infección por este agente (Richardson, 2003; Harrison 2009; Török *et al.*, 2010).

La mayoría de los casos no son diagnosticados hasta la aparición de los síntomas y signos neurológicos, siendo la infección del cerebro y las meninges la forma clínica más común y la principal causa de muerte durante la infección criptocócica. Generalmente se instaura de forma insidiosa, cursando con cefalea mantenida y fiebre (38-39 °C). Además se puede presentar bajo la más variada sintomatología correspondiente a este sistema. Debido a que su presentación clínica es inespecífica, resulta importante considerar su diagnóstico en todo paciente seropositivo al VIH con fiebre y la re-evaluación de infección por el complejo *C. neoformans* a intervalos regulares, aún cuando las investigaciones iniciales sean negativas (Casadevall y Perfect, 1998; Richardson, 2003; Harrison, 2009).

Otros sitios frecuentemente atacados son la piel y la próstata. Esta última es considerada como un reservorio importante en el hombre. No obstante, *C. neoformans* puede invadir de forma aislada o simultáneamente, cualquier parte del cuerpo durante el proceso de diseminación con manifestaciones propias de cada localización (Casadevall y Perfect, 1998; Richardson, 2003; Török *et al.*, 2010).

II.3. Diagnóstico y caracterización molecular

El diagnóstico microbiológico de la criptococosis se basa en el examen microscópico directo de la muestra, el aislamiento de la levadura así como la realización de pruebas bioquímicas y serológicas. No obstante, estos métodos presentan algunos inconvenientes que pudieran conducir a errores en la identificación (Huston y Mody, 2009). Los métodos fenotípicos por ejemplo, son laboriosos, consumidores de tiempo y en ocasiones imprecisos debido a la subjetividad en la interpretación de los resultados (Wengenack y Binniker, 2009).

Los métodos automatizados y semiautomatizados tales como el API 20C AUX y VITEK respectivamente permiten la obtención de resultados en aproximadamente 72 h; estos, sin embargo, presentan sus propias limitaciones ya que dependen de pruebas complementarias para la identificación del aislamiento (Gündeş *et al.*, 2001; Massonete *et al.*, 2004). Durante el diagnóstico inmunológico, por su parte, se observa la ocurrencia de falsos positivos debido a reacciones cruzadas con el factor reumatoideo, *Trichosporon* spp. y contaminaciones con gérmenes gramnegativos fundamentalmente (Huston y Mody, 2009).

Aunque no se aplican al diagnóstico de rutina, existen métodos moleculares disponibles para la detección de secuencias genéticas específicas del complejo *C. neoformans*, tanto a partir de muestras clínicas como de cultivos (Bovers *et al.*, 2007; Wengenack y Binnicker, 2009). Estas herramientas permiten la identificación de las especies del complejo *C. neoformans* y otras descritas menos frecuentemente como *C. laurentii*, proporcionando resultados más completos que el diagnóstico convencional con lo cual contribuyen a una mejor comprensión de la epidemiología y la historia natural de la criptococosis. Estas a su vez, se pueden emplear para conocer la presencia de determinados genotipos en una población dada, permitiendo el estudio de la diversidad de especies en el medio ambiente (Leaw *et al.*, 2006).

Dada la estrecha vinculación de este trabajo con algunas de estas herramientas durante el estudio de la criptococosis y su agente causal, a continuación se describen brevemente algunas de ellas.

Hibridización ADN-ADN: Se basa en la propiedad intrínseca de la complementariedad de las bases nitrogenadas y fue una de las primeras aplicadas en los estudios moleculares de diversos patógenos incluyendo el complejo *C. neoformans*. Constituye una poderosa herramienta para el desarrollo de cebadores específicos y actualmente se emplea en investigaciones académicas para determinar las variaciones genéticas entre aislamientos de diferentes áreas geográficas (Hu *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010).

Electrocariotipaje: Fue la primera técnica empleada para el análisis cromosomal de *C. neoformans*. La misma consiste en la separación de grandes fragmentos de ADN a través de su re-orientación en un gel de agarosa bajo la acción de campos alternos de electricidad. Polacheck y Lebens fueron los primeros en visualizar el cromosoma de *C. neoformans* y

C. gattii a través de un sistema de electroforesis con campos hexagonales alternantes, el cual reveló que ambas especies difieren en el número de bandas cromosomales. Debido a su complejidad elevada actualmente su aplicación en los estudios de *C. neoformans* es muy limitada (Polacheck y Lebens, 1989).

PCR: Entre las múltiples herramientas para manipular y obtener datos a partir de ADN, esta técnica permite la obtención de múltiples copias de segmentos pequeños y específicos del genoma. La misma facilitó el avance en el diagnóstico de la criptococosis con suficiente especificidad y sensibilidad mediante la detección de cantidades mínimas de especímenes. Esta tiene las siguientes ventajas: i) ser rápida y de ejecución sencilla, ii) menos costosa que la hibridación, iii) puede ser totalmente automatizada, iv) aplicable a muestras contaminadas o cultivos mixtos, v) se puede usar en combinación con otras técnicas haciéndola útil como herramienta para estudios de epidemiología molecular. Las variantes más usadas en la identificación de *C. neoformans* y *C. gattii* son la PCR anidada, la PCR múltiple y la PCR en tiempo real. Entre las secuencias dianas empleadas más frecuentemente se destacan *URA5*, *CAP59*, *M13* e ITS (18S, 5.8S y 28S). De todas ellas, la última es la más usada para la detección de secuencias fúngicas, especialmente debido a su alto grado de variación y la presencia de aproximadamente 100 copias por genoma haploide (Hsu *et al.*, 2003; Pryce *et al.*, 2006).

PCR-fingerprinting: Se fundamenta en la detección de secuencias de ADN repetitivo hipervariables. Se considera como una de las técnicas moleculares más rápidas para la detección de patrones de bandas. Se utiliza para confirmar un tipo molecular determinado en los casos esporádicos de enfermedad o durante los estudios de epidemiología molecular. El hecho de utilizar cebadores cortos fundados en secuencias arbitrarias durante la amplificación elimina la necesidad de conocer previamente la secuencia lo que proporciona una mayor capacidad de discriminación para la caracterización en comparación con los análisis bioquímicos y serológicos. Debido su elevada sensibilidad y especificidad para detectar diferencias inter- e intra- variedad permite la diferenciación rápida de *C. neoformans* y *C. gattii*. Entre las secuencias dianas más utilizadas se encuentran el ARNr y ADNr (18S, 5.8S y 28S) y *URA5*, *CNLAC1*, *CAP59*, *CAP64*, *PBL1*, *M13*, y *GACA4*. Los estudios basados en la toma de “huellas dactilares” permiten la clasificación de los aislamientos clínicos y ambientales en 8 tipos moleculares mayores; sin embargo, todavía no hay una correlación exacta entre el serotipo y los tipos moleculares de *C. gattii* (Meyer *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Mueller y Wolfenbarger, 1999; Kidd *et al.*, 2007).

RAPD: Consiste en la amplificación de ADN genómico a través de cebadores simples con secuencias de nucleótidos arbitrarios. Detecta el polimorfismo sin información sobre la secuencia de nucleótidos específica. Este método permite la diferenciación de las variedades, serotipos, y los tipos moleculares de las principales especies patógenas del género. Se emplea para estudiar la variabilidad genética de *Cryptococcus* spp. provenientes de diferentes fuentes, para determinar el perfil genético de cepas obtenidas de pacientes con VIH de una determinada región geográfica o de diferentes sitios anatómicos. En la actualidad, su uso se ha sustituido por métodos más recientes que tienen mayor resolución (García-Hermoso *et al.*, 1999; Litvintseva *et al.*, 2005).

RFLP y PCR-RFLP: Ambas se basan en el análisis del polimorfismo de regiones variables del ADN y son específicas para la detección rápida de los serotipos y los tipos moleculares del complejo *C. neoformans*. La diferencia básica entre ellas está en que con el RFLP se analiza la variación de la longitud de los fragmentos del ADN genómico digeridos previamente con una enzima de restricción y el PCR-RFLP analiza solo el polimorfismo de un fragmento amplificado y digerido posteriormente con endonucleasas. Los estudios de epidemiología molecular demuestran que esta última se puede aplicar para determinar la posible relación entre los aislamientos del complejo *C. neoformans* clínicos y ambientales y para el diagnóstico de casos específicos. El empleo de la secuencia del gen *URA5* es una de las más utilizadas en la misma. (Boekhout *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2003; Kidd *et al.*, 2007).

AFLP: Es una de las técnicas más avanzadas para la obtención de un gran número de marcadores moleculares distribuidos dentro de los genomas tanto de procariontes como de eucariotes. Es más eficiente que el PCR-RFLP, ya que combina una alta especificidad, alta resolución y alto poder de muestreo. Adicionalmente, es excelente en la detección de variabilidad genética ya que además explora la presencia o ausencia del polimorfismo en los sitios de restricción. Permite agrupar a las especies del complejo *C. neoformans* en seis tipos moleculares (anexo 1) y comparar los resultados obtenidos a través de otras técnicas de tipificación (Ej. la serotipificación). Entre sus principales limitaciones se encuentran: ser una técnica laboriosa (con varias etapas para su ejecución), mayor cantidad de reactivos y aparatos de laboratorio necesarios, y la calidad exquisita del ADN, factor crucial para el éxito de la técnica. Hoy en día, el uso de AFLP para la tipificación del complejo *C. neoformans* también se asocia a estudios de virulencia (Mueller y Wolfenbarger, 1999; Boekhout *et al.*, 2001; Barreto de Oliveira *et al.*, 2004; Enache-Angoulvant *et al.*, 2007; Bovers *et al.*, 2008b; Leal *et al.*, 2008; Litvintseva y Mitchell, 2009; Byrnes *et al.*, 2009).

MLST: Constituye una de las herramientas más importantes para los estudios de la epidemiología global y de la estructura de población. Se basa en la variación de la secuencia de nucleótidos de múltiples genes como los que codifican la cápsula, la ureasa, la fosfolipasa, y la producción de lacasa. Es de gran valor para la determinación de genotipos circulantes del complejo *C. neoformans* en diferentes partes del mundo. Entre sus ventajas cuentan la de ser altamente reproducible y concisa, sus resultados pueden ser analizados a través de programas bioinformáticos específicos y además pueden ser intercambiados entre los laboratorios. Por otra parte, los datos generados se pueden utilizar para diferenciar aislamientos e investigar las relaciones evolutivas. Recientemente, el grupo de trabajo dedicado a los estudios genotípicos de *C. neoformans* y *C. gattii* de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal publicó el esquema de MLST acordado para los estudios de secuencias multilocus de ambas levaduras (Litvintseva *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Hiremath *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009; Urwin y Maiden, 2003).

Tipificación mediante STR: Sus primeras aplicaciones fueron en los estudios forenses y de paternidad pero sus múltiples ventajas favorecieron su expansión a otros campos. Los STR son secuencias de ADN en las que un fragmento (cuyo tamaño va desde uno hasta seis nucleótidos) se repite de manera consecutiva. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. Al igual que el MLST es altamente reproducible y sus resultados comparables fácilmente intra- e inter- laboratorios (Hanafy *et al.*, 2008; de Valk *et al.*, 2009; Klaassen, 2009)

Actualmente, la tipificación molecular de los microorganismos juega un papel mucho más amplio que la simple determinación de los patrones genéticos que caracterizan un aislamiento. El desarrollo de estas técnicas trajo consigo nuevas posibilidades a los campos de la taxonomía, identificación y diagnóstico, así como al esclarecimiento sobre la filogenia y evolución de los mismos. La acumulación de los datos generados por estos métodos debe tener en el futuro, un impacto positivo sobre el control de especímenes resistentes y en un mejor manejo de la enfermedad (Costa *et al.*, 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2011).

II.4. Manejo de los pacientes con criptococosis. Nuevas opciones terapéuticas

Entre las enfermedades infecciosas, el tratamiento de la criptococosis ha sido uno de los más estudiados; sin embargo, todavía quedan muchos aspectos terapéuticos por resolver. 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 % alcanzando el 100 % en los pacientes que no reciben tratamiento oportuno (Perfect *et al.*, 2010). Los múltiples trabajos publicados sobre este tema coinciden en que entre los esquemas evaluados, el más efectivo consiste en la aplicación de una fase de inducción, seguida de consolidación y finalmente, con vistas a disminuir las frecuentes recidivas (~ 50 % de los que sobreviven el episodio inicial), una fase de mantenimiento en aquellos pacientes con conteos de linfocitos CD4⁺ ≤ 200 células/mL (Casadevall y Perfect, 1998; Perfect *et al.*, 2010; Török *et al.*, 2010).

Durante la primera fase, el tratamiento recomendado se basa en la combinación de dos o más medicamentos. Los de elección consisten en anfotericina B (0,7-10 mg/kg/d) y 5-fluorocitosina (100 mg/kg/d) durante 2 semanas. Entre las alternativas disponibles se encuentran las formulaciones liposomales de anfotericina B y en los casos de no disponibilidad o intolerancia a alguno de los medicamentos mencionados, su sustitución por el fluconazol (800-400 mg/d) o el itraconazol (400 mg/d). Durante la fase de consolidación se recomienda el empleo del primero (400 mg/d) durante 8 semanas, dosis que se reduce a la mitad por no menos de un año en la siguiente fase. Como alternativas han sido evaluados el itraconazol (400 mg/d) y la anfotericina B (1 mg/kg/semana) (Perfect *et al.*, 2010). La reducción o supresión de los tratamientos esteroideos cuando sea posible, la administración de interferón gamma y de la anfotericina B por vía intratecal o intraventricular, así como la escisión quirúrgica de las lesiones, son aplicadas en casos de fallo terapéutico (Richardson, 2003; Perfect *et al.*, 2010; Török *et al.*, 2010). La estrategia mejor para el manejo de la presión endocraneana no está bien establecida, pero las evidencias demuestran que el drenaje de líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante diferentes métodos ofrece los mejores resultados (Casadevall y Perfect, 1998; Török *et al.*, 2010).

A pesar de los avances logrados, las cifras alarmantes de fallos terapéuticos y recaídas indican la carencia de un régimen fungicida óptimo para el control de esta infección, lo que

hace necesario la evaluación de nuevas estrategias. En este sentido se investiga sobre un espectro amplio de opciones, que incluyen desde la inmunización (tanto activa con antígeno polisacárido de la levadura como pasiva con anticuerpos monoclonales específicos anti-*C. neoformans*) hasta la evaluación de nuevos antifúngicos (Mondon *et al.*, 1999; Espinel-Ingroff, 2003; Thompson *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2009; Saylo *et al.*, 2010; Chow y Casadevall, 2011).

A pesar de que ciertos antifúngicos desarrollados más recientemente ya se encuentran licenciados para uso en humanos, aún resulta difícil el tratamiento de algunos pacientes, lo que hace necesaria la búsqueda de otras alternativas terapéuticas. Nuevas generaciones de azoles tales como el ravuconazol, el albaconazol y el isavuconazol se encuentran actualmente en diferentes estadios de desarrollo (Guinea y Bouza, 2008; Fera *et al.*, 2009). El espectro antifúngico de este último parece ser similar al del voriconazol y el posaconazol, demostró una potente actividad *in vitro* frente a las especies *Candida*, *Aspergillus*, *Scedosporium* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Zygomycetes*, así como frente a hongos pigmentados menos frecuentes (*Exophiala* spp. y *Phialophora* spp.) y hasta el momento no ha sido reportada resistencia cruzada con el fluconazol (Hagen *et al.*, 2010a; Pasqualotto y Denning, 2008; Thompson *et al.*, 2009; Thompson y Wiederhold, 2010; Yamazaki *et al.*, 2010). Adicionalmente, el perfil farmacocinético de esta droga, resulta ventajoso con relación al de otros antifúngicos (baja toxicidad, vida media prolongada, escasa interacción con otros medicamentos y buena tolerancia), permitiendo su administración tanto oral como parenteral (Thompson y Wiederhold, 2010). Este medicamento se encuentra actualmente en fase III de ensayo clínico, pero los escasos datos sobre su costo y eficacia clínica tanto en el tratamiento como en la prevención de las micosis invasivas aún hacen incierta su utilidad (Guinea y Bouza, 2008; Guinea *et al.*, 2010).

En el anexo 3 se resumen las principales características de los antifúngicos evaluados en este estudio.

II.5. Pruebas de susceptibilidad *in vitro*

En la medida que se incrementa el número de antimicrobianos disponibles, se incrementa también la necesidad de métodos confiables para determinar la susceptibilidad de los aislamientos frente a los mismos, contribuyendo de esta forma a la selección de la mejor opción terapéutica. Esta realidad no pasó a ser importante en la micología médica hasta iniciada la epidemia del sida. El empleo del fluconazol generalmente a dosis subterapéuticas para el tratamiento de la candidiasis oroesofágica, desencadenó la emergencia de especímenes resistentes, al tiempo que inducía la selección natural de otras con resistencia innata. Así, fueron los pacientes infectados con el VIH los que proporcionaron las principales evidencias *in vivo* para el posterior desarrollo de las pruebas *in vitro* (Tapia, 2009).

La aplicación de métodos estandarizados y reproducibles para determinar la susceptibilidad permite la comparación de los resultados obtenidos y realizar análisis epidemiológicos a nivel nacional e internacional. Los primeros reportes de resistencia fueron cuestionados sobre la base del empleo de diferentes metodologías con escasa reproducibilidad intra- e interlaboratorios. Los trabajos posteriores demostraron la importancia de ajustar las condiciones de estas pruebas (cuantía del inóculo, la composición del medio de cultivo, el pH, la temperatura y duración de la incubación, entre otros) debido al impacto de los mismos sobre valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) (Rambali *et al.*, 2001). Entre los métodos más empleados y por su relación con este trabajo, se comentarán brevemente algunos de ellos.

Métodos de dilución en medio líquido: El primer método optimizado y estandarizado para el estudio de la susceptibilidad de levaduras fue el de macrodilución en medio líquido. 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, siendo este en la actualidad, el más aceptado como referencia (Johnson *et al.*, 2008; CLSI, 2008a). Desafortunadamente, hasta la fecha solo se encuentran publicados los valores de corte para la 5-fluorocitosina y algunos azoles frente a *Candida* spp (CLSI, 2008b). Aunque el CLSI recomienda la lectura después de 48 h de incubación, la diferencia de los valores de CIM y la interpretación de los mismos (susceptible, susceptible

dependiente de la dosis o resistente) a las 24 h son mínimas. La determinación del valor de CIM es un factor de gran importancia, sobre todo cuando se evidencia una cola de crecimiento, lo cual es especialmente evidente frente a los azoles. En tales casos, se debe definir el punto al cual se produce una reducción de al menos el 50 % del crecimiento con relación al crecimiento en ausencia de la droga en cuestión (CLSI, 2008a).

El Comité Europeo para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobianas (EUCAST, de sus siglas en inglés) ha promovido modificaciones, que en términos prácticos, hacen la prueba de microdilución en medio líquido menos laboriosa, más fácil de interpretar (sobre todo en aislamientos que presentan cola de crecimiento) y más rápida, al arrojar resultados definitivos a las 24 h para *Candida* spp. y 48 h para *Cryptococcus* spp. Aunque según los trabajos publicados al respecto, ambos métodos presenta buena correlación, es conveniente considerar en cada estándar sus propios valores de corte (Espinel-Ingroff *et al.*, 2005, Rodríguez-Tudela *et al.*, 2007, Rodríguez-Tudela *et al.*, 2010).

Debido a la complejidad y al elevado consumo de tiempo, así como a la no siempre fácil interpretación de los resultados que conllevan estas pruebas, se desarrollaron otros métodos que superen estas desventajas. Actualmente 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 Sensitire® YeastOne (TREK Diagnostic Systems LTD, Reino Unido) en el cual se incorporaron antifúngicos disponibles de reciente generación (Johnson *et al.*, 2008).

Etest (AB Biodisk, Suecia): Se describió más recientemente y constituye una de las alternativas más atractivas actualmente disponibles en el mercado. Es uno de los métodos más simples basado en la aplicación de una tira plástica con un gradiente de concentración del antifúngico colocada sobre una superficie de agar previamente inoculada con el aislamiento bajo estudio; después de la incubación, se determina la zona de inhibición interpretándose la CIM como el punto donde la elipse de inhibición intersecta la tira. Una vez que el operador adquiere experiencia en la lectura e interpretación de la prueba, constituye un método confiable y reproducible cuyos resultados muestran buena correlación con el método de referencia (Johnson *et al.*, 2008; Tapia *et al.*, 2009). Entre los inconvenientes más importantes de este método es que la detección de resistencia en

especies usualmente sensibles debe comprobarse por un segundo método. Este hecho es particularmente importante en aislamientos de *Candida tropicalis* los cuales suelen mostrar una cola de crecimiento mayor que otras especies y en *Cryptococcus* debido a su crecimiento relativamente pobre sobre el medio de cultivo recomendado. El empleo del Etest además, brinda un rango mucho más amplio de CIM que el obtenido por otros métodos; así, los aislamientos susceptibles tienden a mostrar valores muy bajos de CIM mientras que los de menor susceptibilidad tienden a presentar valores más altos que los obtenidos en otros tipos de pruebas. El método está estandarizado tanto para levaduras como para hongos filamentosos y actualmente se encuentra disponible para la anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol y caspofungina (Johnson *et al.*, 2008).

Difusión en disco: Es un método sencillo y económico disponible para los antifúngicos solubles en agua tales como la 5-fluorocitosina, fluconazol y voriconazol. Actualmente existen normas descritas por el CLSI para su aplicación e interpretación especialmente para levaduras del género *Candida* (CLSI, 2008c; Johnson *et al.*, 2008). Este provee una zona de inhibición cuyo diámetro fue correlacionado de forma extensiva con los valores de CIM obtenidos por el método de referencia a través de la evaluación de miles de aislamientos en diferentes estudios (Pfaller *et al.*, 2004). A pesar de la disponibilidad de gran variedad de sistemas de discos no todos han sido evaluados por igual. La adición de azul de metileno al medio de cultivo (0,5 µg/mL), parece brindar una mejor definición de la zona de inhibición y facilitar la lectura de la prueba (CLSI, 2008c).

Estas metodologías pudieran predecir la respuesta clínica al tratamiento, sin embargo, en el marco de las micosis invasivas, aún existen un gran número de factores que pudieran ser ambiguos cuando se trata de interpretar la actividad *in vitro* de los agentes antifúngicos. En este sentido los análisis de farmacodinámica y farmacocinética conjuntamente con la identificación de los mecanismos de resistencia han sido de gran utilidad en el establecimiento de los valores de corte al menos para algunos de los agentes sistémicos activos frente a ciertas levaduras (Tapia, 2009).

Aunque hasta la fecha la anfotericina B es uno de los antifúngicos con mayor espectro de actividad, existen reportes que sugieren la presencia de algunas especies menos susceptibles

(Lozano *et al.*, 1998; Arikan, 2007; Johnson *et al.*, 2008). En cuanto a la 5-fluorocitosina, solo unos pocos hongos filamentosos resultan susceptibles a la misma, a lo que se ha sumando la emergencia de aislamientos resistentes, hecho que ha limitado aún más su uso (Schwarz *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que los regímenes de tratamiento con azoles a dosis máximas por períodos cortos son menos propensos a inducir pérdida de la susceptibilidad a los mismos. Durante la criptococosis, el empleo del fluconazol en la terapia de mantenimiento por tiempo prolongado, posiblemente haya influido en la emergencia de aislamientos resistentes. Aunque se ha demostrado que algunas especies resistentes a esta droga son susceptibles al voriconazol, el posaconazol y el isavuconazol (Birley *et al.*, 1995), en algunas ocasiones se ha logrado demostrar resistencia cruzada entre el fluconazol y otros azoles (Pasqualotto y Denning, 2008; Thompson y Wiederhold, 2010), lo que refuerza la necesidad de métodos rápidos y precisos para determinar la susceptibilidad antifúngica.

El estudio sistemático de la susceptibilidad no solo es útil para definir el espectro de actividad de las drogas disponibles y en desarrollo, para determinar resistencia tanto intrínseca como adquirida, sino también sirven de soporte a los estudios de eficacia clínica. En este sentido, la identificación del agente fúngico puede ser suficiente para alertar al clínico acerca de los posibles resultados del tratamiento (Arikan, 2007; Johnson *et al.*, 2008).

Debido a la frecuencia relativamente baja de aislamientos resistentes y los múltiples factores involucrados en las micosis invasivas, resulta difícil la validación de valores de corte. La interacción entre las drogas antifúngicas y el hospedador, entre el hongo y el hospedador y entre la droga y el hongo es un proceso complejo, por lo que las pruebas de susceptibilidad *in vitro* solo proveen una pequeña parte de la información necesaria para predecir el desenlace del tratamiento. Sin embargo, el desarrollo de los métodos estandarizados de susceptibilidad antifúngica, constituyen un notable avance. Dado el creciente incremento de agentes antimicóticos, estas pruebas contribuyen de forma significativa a la elección del más apropiado, especialmente en las infecciones que comprometen la vida del paciente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Tipo de estudio

El compendio de investigaciones que aquí se presentan se desarrolló en el período comprendido entre agosto de 2006 y diciembre de 2010. El mismo forma parte importante del proyecto ramal de investigación “Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus* a partir de fuentes naturales”.

Además del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” donde se llevó a cabo el trabajo, otras instituciones contribuyeron a su desarrollo: el hospital “Canisius-Wihelmina” y el Centro de Biodiversidad Fúngica (CWZ y CBS, respectivamente, de sus siglas en neerlandés), ambos de los Países Bajos.

Este trabajo consistió en un estudio analítico de corte realizado en diferentes etapas. La primera de ellas estuvo dada por la caracterización taxonómica de todos los aislamientos incluidos; la segunda, la comparación de los patrones genéticos de los especímenes clínicos y ambientales identificados previamente como *C. neoformans* var. *grubii*; la tercera, la caracterización desde el punto de vista genético y de la susceptibilidad a los antifúngicos de los aislamientos obtenidos de pacientes con criptococosis recurrente y la cuarta, abarcó los estudios de susceptibilidad de especímenes identificados como *C. neoformans* var. *grubii*.

III.2. Marco de la investigación

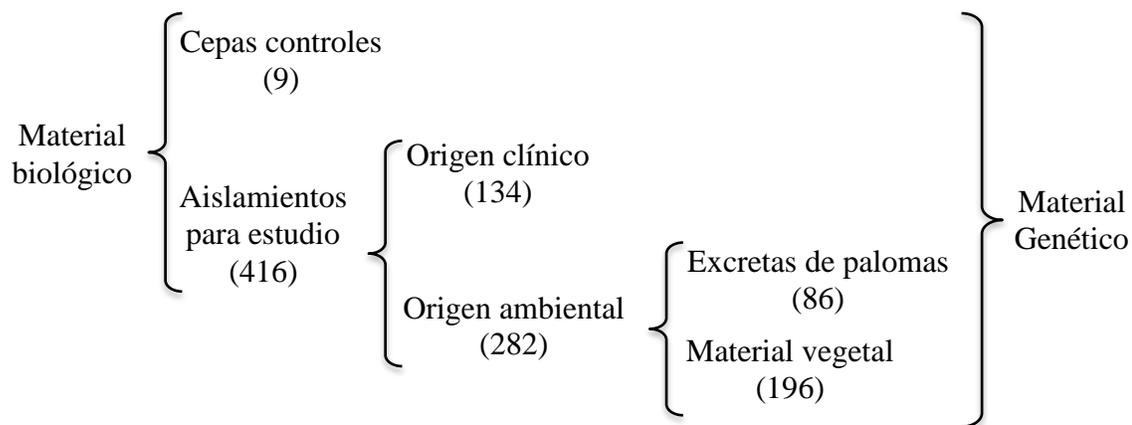
El trabajo tuvo como antecedente, los estudios de prevalencia de *C. neoformans* en palomares urbanos domésticos de Ciudad de La Habana (actualmente La Habana), Pinar del Río y Cienfuegos (Brito, 2000; Fernández, 2001; Rabelo, 2002), así como los relacionados con los aislamientos clínicos obtenidos durante el servicio de diagnóstico que se realiza en el LMIPK desde hace más de 20 años. Estos constituyeron importantes pilares que dieron paso a la búsqueda de posibles explicaciones a la problemática existente en relación a esta micosis y su agente causal, como se detalla en la introducción y la revisión sobre el tema.

III.3. Procedimientos de trabajo

Para su mejor comprensión, el contenido de este acápite se desglosó en diferentes secciones. En estas se detallan, en primera instancia, el material biológico empleado y a continuación cada investigación realizada para dar respuesta a los objetivos planteados.

III.3.1. Material biológico

El material biológico incluido en este presente trabajo estuvo distribuido como se expresa en el diagrama siguiente.



En la figura 1 se muestra la procedencia geográfica de todos los aislamientos a estudiar y en los siguientes subacápites se ofrece una explicación más detallada sobre cada uno de los elementos.



Figura 1. Distribución geográfica de las áreas muestreadas durante la recolección de material vegetal así como de los aislamientos clínicos y obtenidos a partir de excretas de palomas incluidos en el estudio. Las cifras dentro de los círculos representan la cantidad de especímenes recuperados en cada caso (en siete de los aislamientos clínicos no se pudo precisar el origen geográfico de los mismos).

III.3.1.1. Cepas controles

Se emplearon las siguientes cepas controles según se especifica en cada caso:

Cepa	Código	Empleada en los análisis de
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (A α)	CBS 9172	Serotipo/tipo de apareamiento
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (A α)	CBS 8710	Serotipo/tipo de apareamiento
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (D α)	CBS 10511	Serotipo/tipo de apareamiento y STR
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (D α)	CBS 10513	Serotipo/tipo de apareamiento
<i>C. gattii</i> (B α)	CBS 6956	Serotipo/tipo de apareamiento y STR
<i>C. gattii</i> (C α)	CBS 10101	Serotipo/tipo de apareamiento y STR
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (A α)	H99	STR
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i>

Los códigos CBS corresponden a los de la colección del Centro de Biodiversidad Fúngica de Los Países Bajos; ATCC a los de la Colección Estadounidense de Cultivos Tipos; la cepa H99 perteneciente al genotipo AFLP VNI cuya secuencia está publicada en el GenBank con el número de acceso AF542529, se utiliza como secuencia tipo en los estudios genéticos (Meyer *et al.*, 2009).

III.3.1.2. Aislamientos clínicos

Se incluyeron un total de 134 *C. neoformans* obtenidos entre 1987 y 2009 conservados en la colección del LMIPK. Del total, 99 provenían de Ciudad de La Habana y La Habana (según la división política-administrativa vigente en el momento del estudio) y los demás de otras provincias del país como se ilustra en la figura 1. En 12 de ellos no se pudo precisar el tipo de paciente del que fueron recuperados, 95 se aislaron de personas con sida y 25 de sero-negativas al VIH. Según el tipo de muestra, la mayoría (127), se recobraron a partir de LCR y los restantes de: sangre (2), orina, material de biopsia, semen, tejido y lavado bronquioalveolar (uno de cada uno).

Todos los aislamientos fueron previamente identificados como *C. neoformans* ser. A (var. *grubii*) mediante métodos convencionales (Kwon-Chung *et al.*, 1982; Hazen y Howell, 2003) y el juego de reactivos comercial para seroaglutinación Crypto Check Iatron RM 304-K (Laboratorios Iatron, Japón). Estos se encontraban conservados en agua destilada estéril a temperatura ambiente (28 °C) (Castellani, 1967; Yarrow 1998). Antes de su utilización, se comprobó la viabilidad y pureza mediante inoculación por estrías de máximo agotamiento sobre placas de agar dextrosa de Sabouraud (ADS), así como su identidad con el sistema comercial Auxacolor 2 (Bio-Rad, Francia).

III.3.1.3. Aislamientos de material vegetal

Para este estudio se recolectaron 662 muestras de 331 plantas a lo largo de la costa norte de las provincias Ciudad de La Habana y La Habana (según la división política-administrativa vigente en el momento del estudio) entre los meses de abril y junio del 2009 (figura 1).

Criterio de selección: Para el trabajo se escogieron diferentes zonas urbanas con gran cantidad y variedad de especies de árboles. Se incluyeron todos los ejemplares adultos con cavidades o ranuras profundas en el tronco que se encontraban en áreas públicas. Debido a reportes previos de la presencia de levaduras del complejo *C. neoformans* en estas especies (Randhawa *et al.*, 2006; Hiremath *et al.*, 2008; Randhawa *et al.*, 2008; Loperana *et al.*, 2010; Chowdahary *et al.*, 2011), en primera instancia se seleccionaron almendros de la India (*Terminalia cattapa*), *Ficus* spp. y cactáceas (65, 63 y 60 ejemplares respectivamente). Los *Ficus* estuvieron representados en su mayoría por laurel de la India y entre las cactáceas predominaron *Cephalocerus royenii* y *Opuntia* spp.

Por la estrecha relación geográfica con las primeras, entre las especies muestreadas quedaron incluidas también 65 flamboyanes (*Delonix regia*), 60 casuarinas (*Casuarina equisetifolia*), 5 majaguas (*Talipariti elatum*), 3 ceibas (*Ceiba pentandra*), 2 uvas caleta (*Coccoloba uvifera*), 1 copey (*Clusia rosea*), 1 covalonga (*Thevetia peruviana*), 1 flamboyán amarillo (*Peltophorum adratum*), 1 ocuje (*Callophyllum inophyllum*), 1 pino (*Pinus caribea*) y 1 roble blanco (*Tabebuia pentaphylle*)

Las muestras se obtuvieron de dos sitios diferentes de cada planta, mediante hisopados de las ranuras u oquedades. Cada hisopo se depositó en tubo de vidrio estéril que contenía 2 mL de solución salina estéril (SSE). Estos se transportaron al LMIPK y se procesaron en un tiempo no mayor de 4 h, según lo descrito en la literatura consultada (Randhawa *et al.*, 2005). Se inocularon en placas de Petri con medio mínimo de agar ácido caféico (AAC) (anexo 4) (Vidotto *et al.*, 2004). Las placas inoculadas se mantuvieron a 35 °C durante 5-7 días y se les practicó un examen estereoscópico diario. Se seleccionaron aquellas colonias que tenían características morfológicas compatibles con las producidas por las levaduras del género *Cryptococcus*. Dichas colonias se transfirieron a placas de Petri con medio ADS suplementado con 0,05 g/L de cloranfenicol mediante siembra por estrías de máximo agotamiento, con el fin de obtener colonias aisladas. La identificación presuntiva se realizó de acuerdo a las características macro- y micro- morfológicas, la capacidad de crecer a 37 °C, la detección de actividad ureasa y fenoloxidasas, la asimilación de inositol como única

fuente de energía y el crecimiento en medio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (Kwon-Chung *et al.*, 1982; Hazen y Howell, 2003).

III.3.1.4. Aislamientos de excretas de palomas

Los aislamientos de excretas de palomas fueron identificados previamente siguiendo la metodología descrita a partir de material vegetal.

Se incluyeron 86 aislamientos procedentes de: Pinar del Río (n = 31) (Fernández, 2001), La Habana (n = 6) (Brito, 2000), Cienfuegos (n = 8) (Rabelo, 2002), Holguín (n = 20) y Santiago de Cuba (n = 21) (estas últimas obtenidas por la propia autora en el 2006 siguiendo igual metodología a la descrita en los trabajos anteriores). Tres del total fueron identificadas presuntivamente como *C. gattii* de acuerdo a sus características en el medio CGB.

III.3.1.5. Obtención del material genético

El material genético se obtuvo a partir de cultivos frescos de los aislamientos para estudio y las cepas controles en ADS incubados a 30 °C durante 48 h. Se prepararon suspensiones en solución de lisis (Roche Diagnostics, Países Bajos) y se sometieron a ruptura mecánica en MagnaLyser (Roche Diagnostics) durante 30 seg a 6500 rpm. A continuación, se purificó el ADN mediante el LC MagnaPure empleando el estuche III según lo recomendado por el fabricante (Roche Diagnostics). La pureza y el rendimiento obtenido se estimaron por la absorbancia a 260/280 nm de luz UV en espectrofotómetro 130 Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, EE.UU.).

III.3.2. Investigaciones realizadas para dar respuesta a los objetivos propuestos

III.3.2.1. Caracterización taxonómica hasta nivel de serotipo y tipo de apareamiento de los aislamientos cubanos de *Cryptococcus*

La identidad de los 146 aislamientos investigados se confirmó mediante métodos moleculares. En un primer paso se realizó un análisis de los patrones genéticos mediante AFLP.

Posteriormente se seleccionó el 10 % de los aislamientos de cada agrupación genética para su identificación hasta el nivel de especie por secuenciación de las regiones ITS1/5.8S/ITS2 del ARNr y D1-D2 del ADNr. Finalmente, a todos los especímenes pertenecientes al complejo *C. neoformans* se les determinó su serotipo y tipo de apareamiento según se describe a continuación.

III.3.2.1.1. AFLP (Boekhout *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2009).

Preparación de la reacción: Alrededor de 50 ng del ADN genómico se sometió a un procedimiento combinado de restricción-ligación con 5 pmol de los adaptadores EcoR I y Mse I, 2 U de EcoR I (New England Biolabs, EE.UU.), 2 U de Mse I (New England Biolabs) y 1 U de T4 ADN ligasa (Promega, Países Bajos), en un volumen total de 20 µL de tampón de reacción durante 1 h a 20 °C. A continuación, la mezcla se diluyó cinco veces con 10 mM Tris-HCl pH 8,3. Los adaptadores se confeccionaron mediante la mezcla de cantidades equimolares de oligonucleótidos complementarios (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' y 5'-AATTGGTACGCAGTC-3' para EcoR I; 5'-GACGATGAGTCCTGAC-3' y 5'-TAGTCAGGACTCAT-3' para Mse I) y calentamiento a 95 °C, seguido de enfriamiento lento a temperatura ambiente. Un microlitro de la mezcla de restricción-ligación se utilizó para la amplificación en un volumen de 25 µL en las siguientes condiciones: cebador EcoR I (1 µM) con dos residuos selectivos (5'-Flu-GTAGACTGCGTACCCGTAC-3'), cebador Mse I (1 µM) con el residuo selectivo (5'-GATGAGTCCT GACTAAG-3'), dNTP (0,2 mM) y *Taq* ADN-polimerasa (1 U) (Roche Diagnosics) en tampón de reacción con MgCl₂ (1,5 mM).

Condiciones de la amplificación: Después del paso inicial de desnaturalización durante 4 min a 94 °C, se aplicaron 20 ciclos: 15 seg de desnaturalización a 94 °C seguido de 15 seg de hibridación a 66 °C. La temperatura de cada ciclo se disminuyó en 0,5 °C y un minuto de extensión a 72 °C. Posteriormente, se aplicaron 30 ciclos con una temperatura de 56 °C. Una vez completados los ciclos, se realizó una incubación adicional a 72 °C durante 10 min. A continuación, se prosiguió con enfriamiento lento del producto de la reacción

hasta alcanzar la temperatura ambiente, los amplicones se combinaron con ET400-R de tamaño regular (GE Healthcare, Bélgica) y se analizaron en la plataforma automática MegaBACE 500 (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Electroforesis capilar (de Valk *et al.*, 2007): Después de la amplificación, los productos de reacción se diluyeron 10 veces con agua destilada. Un mililitro de los productos diluidos se combinó con 0,25 mL del marcador de ET-ROX550 (GE Healthcare) y 8,75 mL de agua destilada. Después de un minuto de desnaturalización a 94 °C, las muestras se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente y inyectaron en la plataforma de análisis automático de ADN MegaBACE 500 equipada con una matriz de 48 capilares según lo recomendado por el fabricante (GE Healthcare). Los electroferogramas se analizaron mediante el programa Fragment Profiler versión 1,2 (GE Healthcare).

Análisis de datos: Los datos se importaron al programa BioNumerics versión 5,0 (Applied Maths, Bélgica) y se analizaron mediante el método de las variables no ponderadas (UPGMA, de sus siglas en inglés) usando el coeficiente de correlación de Pearson.

III.3.2.1.2. Secuenciación nucleotídica de las regiones ITS1/5.8S/ITS2 y D1-D2 (Katsu *et al.*, 2004)

Como paso previo se realizó la amplificación de los fragmentos de interés mediante PCR para lo cual se empleó un volumen total de 50 µL que contuvo: 1 µL de ADN (aproximadamente 20-100 ng), cebadores V9 y RLR3R (0,5 µM) según se describen en la tabla 1, dNTP (0,2 mM), MgCl₂ (2 mM) y Fast StartTaq ADN polimerasa (1 U) (Roche Diagnostics) diluidos en el tampón de reacción.

Tabla 1. Combinación de cebadores empleados tanto en la determinación del serotipo y tipo de apareamiento como en la secuenciación de los aislamientos estudiados.	
Cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')
LR3	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
V9	5'-TGCGTTGATTACGTCCCTGC-3'
RLR3R	5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-3'
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'

Condiciones de la amplificación: Después de la desnaturalización inicial durante 10 min a 94 °C, se aplicaron 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 52 °C y 2 min a 72 °C. Inmediatamente, se realizó incubación adicional durante 10 min a 72 °C y se prosiguió con enfriamiento lento hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Los productos amplificados se purificaron mediante SPRI chemistry (AMPure Beckman Coulter, Países Bajos) y sujetos a análisis bidireccional de secuencias con los cebadores ITS1 e ITS4 para la región ITS1/5.8S/ITS2 así como NL1 y RLR3R para la región D1-D2 (tabla 1). La secuenciación se realizó mediante el empleo del juego DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La amplificación de los productos se realizó mediante SPRI chemistry (CleanSeq Beckman Coulter, Países Bajos) en plataforma MegaBACE 500 según lo recomendado. Las secuencias de ADN obtenidas se analizaron con el programa Sequence Analyzer versión 3 (GE Healthcare) y se compararon con las depositadas en las base de datos públicas (GenBank) y en el CBS-KNAW del Centro de Biodiversidad Fúngica (Países Bajos) mediante el programa BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Altschul *et al.*, 1997).

III.3.2.1.3. Determinación del serotipo y tipo de apareamiento (Barreto de Oliveira *et al.*, 2004; Bovers *et al.* 2008a)

La amplificación de los alelos *MATa* y *MATα* del *locus STE20* tanto del serotipo A como D se materializó a través de cuatro PCR.

Preparación de las reacciones: Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L conteniendo solución de corrida amortiguadora (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina 0,01 %, Tritón X₁₀₀ 0,1 %, pH 8,3), dNTPs (0,2 mM), *Taq* ADN-polimerasa (0,5 U) (Gentaur, Bélgica), ADN molde (1 μ L) y cebadores según el caso (15 pmol) (tabla 2).

Tabla 2. Combinación de cebadores empleados tanto en la determinación del serotipo y tipo de apareamiento como en la secuenciación de los aislamientos estudiados.			
Alelo o domino	Cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')	Talla (pb)
<i>MATα</i> serotipo A (<i>STE20αA</i>)	JOHE 7264	5'-AGCTGATGCTGTGGATTGAATAC-3'	1.200
	JOHE 7265	5'-GTTCAATTAATCTCACTACCTGTAG-3'	
<i>MATα</i> serotipo D (<i>STE20αD</i>)	JOHE 7267	5'-ATAGGCTGGTGCTGTGAATTAAG-3'	1.200
	JOHE 7268	5'-GTTCAAGTAATCTCACTACATGCG-3'	
<i>MATa</i> serotipo A (<i>STE20aA</i>)	JOHE 7270	5'-ATCAGAGACAGAGGAGGAGCAAGAC-3'	870
	JOHE 7272	5'-TCCACTGGCAACCCTGCGAG-3'	
<i>MATa</i> serotipo D (<i>STE20aD</i>)	JOHE 7273	5'-GTTTCATCAGATACAGAGGAGTGG-3'	870
	JOHE 7275	5'-CTCCACTGTCAAACCTACGGC-3'	

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.

Como controles positivos para cada una de las cuatro reacciones se incluyeron los aislamientos de referencia de *Cryptococcus* CBS9172 (Aa), CBS8710 (Aα), CBS10511 (Da) y CBS10513 (Dα) y como negativos CBS6956 (Bα); CBS10101 (Cα) y agua. Los productos amplificados se observaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 5 % en un ABI310 Sequencer (PE Biosystems, EE.UU.).

III.3.2.2. Determinación de las posibles fuentes de infección por *C. neoformans* var. *grubii*

De acuerdo al número de aislamientos disponibles en el momento de realizar este estudio, quedaron incluidos en el mismo 122 clínicos (de pacientes diferentes), 68 obtenidos a partir de excretas de palomas y uno procedente del material vegetal muestreado. Como método de análisis se utilizó la tipificación mediante STR. A modo de referencia se empleó el AFLP, según se describió en la sección III.3.2.1.1.

Para la tipificación con STR se identificó y evaluó un panel de nueve marcadores a partir de la secuencia del genoma de la cepa tipo H99 mediante el programa Tandem Repeat Finder (Benson, 1999) según los criterios establecidos (de Valk *et al.*, 2007). Dicho panel quedó constituido por: tres dinucleótidos (CNA2), tres trinucleótidos (CNA3) y tres tetranucleótidos (CNA4) (tabla 3). Cada uno se amplificó con un PCR múltiple fluorescente (de Valk *et al.*, 2009; Klaassen, 2009).

Para demostrar la especificidad de los cebadores seleccionados se aplicó ADN de las cepas CBS10511 (*C. neoformans* ser. D), CBS6956 (*C. gattii* ser. B) y CBS 10101 (*C. gattii* ser. C).

Uno de los cebadores de cada panel se marcó con hexacarboxifluoresceína, hexaclorofluoresceína o tetraclorofluoresceína. Para la reacción de amplificación se utilizó un volumen de 50 µL que contenía: ADN (1 ng), Fast Start Taq ADN-polimerasa (1 U) (Roche Diagnostic), MgCl₂ (2 mM), dNTP (0,2 mM) disueltos en el tampón de reacción (Roche Diagnostic) y los cebadores según se expresa en la tabla 3.

Protocolo de amplificación: Este consistió en 10 min de desnaturalización/activación seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 seg y 72 °C durante 1 min. Después de una incubación adicional de 10 min a 72 °C los productos de las reacciones se enfriaron a 28 °C.

Electroforesis capilar: Se realizó según se describe en 3.2.1.1 (AFLP). Los electroferogramas se analizaron mediante el programa Fragment Profiler versión 1,2 (GE Healthcare). El número de repeticiones se comparó con el obtenido con la cepa H99 la cual se utilizó como control en todos los experimentos.

Tabla 3. Características básicas del panel de marcadores microsatélites seleccionados.						
Subpanel	Marcador	Cromosoma: posición	Unidad de repetición	Secuencia del cebador marcado (5' - 3')	Secuencia del cebador no marcado (5' - 3')	Conc. (μ M)
CNA2	CNA2a	11: 389201– 389350	CT	FAM- CGAGGTCATGTTGTGAGTCC	<u>G</u> TGACCGTCTCGTTCTTCTCA	0,3
	CNA2b	9: 191563– 191711	TG	HEX- TCGTCAACGATGCAAGTCTC	GGGCCTGGGAAATAGGTAGA	0,3
	CNA2c	10: 307773– 306912	TA	TET- AGAAGCACATGGGGAAAGG	GCGCAGTTTGAAGATGAGAA	0,1
CNA3	CNA3a	11: 1281429– 128147-16	CTA	FAM- ACCCCTGCCCATCATA	<u>G</u> CACAGGCATAAAGCTAAGTGTGA	0,3
	CNA3b	4: 339525– 339664	TCT	HEX- TGGGGATATCGATTCTTCTC	GATTGGTATGGGAAGCGTTG	0,3
	CNA3c	7: 285123– 285270	CCA	TET- TGGAAGAGGATGGAGCGTAT	GCATAGTTTATCGTTTTCTCTTTTC	0,3
CNA4	CNA4a	5: 233120– 233445	TTAT	FAM- CGTCGAAGACTGCACAAAAA	<u>G</u> TTCTGTATGACAGGTCGCAAA	1,0
	CNA4b	4: 1021855– 1022020	ATCC	HEX- CGGATGAGATGGAAAGAAGG	GTGCGTCTGTCAAAAGATTGC	0,3
	CNA4c	14: 131866– 132031	TATT	TET- AGATGTCTGGCGATGTTG	GAGGAGCAAGCAATCAAACC	0,3
* Los residuos subrayados no se corresponden con la secuencia genómica. Estos se introdujeron para minimizar la formación de picos A negativos, los cuales constituyen artefactos de PCR bien conocidos que pudieran interferir la interpretación de los resultados (de Valk <i>et al.</i> , 2007).						

Análisis de datos: Los datos se importaron al programa BioNumerics versión 5,0 (Applied Maths). Los microsatélites se analizaron mediante el coeficiente de similitud categórica según la fórmula:

$$\hat{D} = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Donde n_i constituye el número de individuos que se desea contar y N el total de todos los individuos contados (Simpson, 1949)

Se consideraron idénticos aquellos aislamientos con igual número de repeticiones de cada marcador, mientras que los genotipos que diferían hasta en dos repeticiones se consideraron genéticamente relacionadas y los que diferían en más de dos, como no relacionados. Para este trabajo se definió como complejo de microsatélites (CM) a un grupo de dos o más genotipos cuya variabilidad fue atribuible solamente a uno o dos marcadores.

III.3.2.3. Caracterización de los aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii* obtenidos de pacientes con meningitis recurrente

Del total de aislamientos disponibles al momento del estudio, se seleccionaron todos los obtenidos de pacientes con infecciones recurrentes. Quedaron incluidos 19 aislamientos procedentes de siete pacientes (seis VIH positivos y uno VIH negativo). Todos los individuos habían ingresado en el Centro de Atención Médica a pacientes con sida del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) entre 1995 y 2001, justo antes de iniciarse en Cuba la TARVAE. Los aislamientos iniciales se obtuvieron al momento del diagnóstico y antes de implementar el tratamiento; mientras que, los subsecuentes se recibieron durante o después del empleo de fármacos antifúngicos (tabla 4).

A este grupo de aislamientos se les determinó la susceptibilidad *in vitro* frente a los antifúngicos empleados en el tratamiento de los mismos y sus perfiles genotípicos.

Tabla 4. Datos clínico-epidemiológicos de los pacientes incluidos en el estudio, origen y fecha de obtención de los aislamientos.

Paciente N°	Sexo	VIH/ Diagnóstico (año)	Tipo de muestra	Fecha de aislamiento	Intervalo entre cada aislamiento (días)	Total de días	Tratamiento antifúngico
1	M	+ /1991	Sangre	14/04/95	0	0	Anf B+Flu Flu (mantenimiento)
			LCR	14/04/95	0	0	
			LCR	18/07/95	96	96	Anf B+Flu
2	M	+ /1990	LCR	05/09/95	0	0	Flu+Itr
			Orina	08/12/95	95	95	Flu
			LCR	10/01/96	34	129	
3	F	+ /1994	LCR	18/01/96	0	0	Anf B+Flu Flu (mantenimiento)
			LCR	29/02/96	34	34	
4	M	+ /1995	LCR	09/04/97	0	0	Anf B+5FC+Flu
			LCR	23/04/97	14	14	
5	M	+ /1998	LCR	15/04/00	0	0	Anf B Flu (mantenimiento)
			LCR	26/10/00	194	194	
6	F	+ /1996	LCR	12/06/00	0	0	Anf B+Flu Flu (mantenimiento)
			LCR	12/10/00	123	123	
			LCR	30/10/00	19	142	Anf B+5FC
7	M	-	LCR	09/01/01	0	0	Anf B+Flu Flu (mantenimiento)
			LCR	17/04/01	99	99	
			LCR	07/06/01	52	151	Flu+Itr
			Semen	19/06/01	13	164	Anf B liposomal

Anf B=anfotericina B; 5FC= 5-fluorocitosina; Flu=fluconazol; Itr=itraconazol

III.3.2.3.1. Determinación de la susceptibilidad *in vitro*

Los patrones de susceptibilidad se determinaron mediante el método de microdilución en medio líquido según las directrices del documento M27-A3 (CLSI, 2008a)

Medio de cultivo: Se empleó el medio sintético RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Países Bajos) preparado según se detalla en el anexo 4.

Antifúngicos:

- Anfotericina B (Sigma-Aldrich). Las soluciones “madres” se prepararon a concentraciones de 0,016 a 8 µg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) y las de trabajo de 0,008 a 4 µg/mL en RPMI 1640.
- 5-fluorocitosina (Valeant, Países Bajos): Las soluciones “madres” se prepararon a concentraciones de 0,063 a 32 µg/mL en agua destilada estéril y las de trabajo de 0,032 a 16 µg/mL en RPMI-1640.
- Fluconazol (Pfizer, Reino Unido): Las soluciones “madres” se prepararon a concentraciones de 0,063 a 32 µg/mL en agua destilada estéril y las de trabajo de 0,032 a 16 µg/mL en RPMI-1640.
- Itraconazol (Janssen-Cilag, Países Bajos): Las soluciones “madres” se prepararon a concentraciones de 0,016 a 8 µg/mL en DMSO y las de trabajo de 0,008 a 4 µg/mL en RPMI 1640.

Preparación de las placas: Las determinaciones se realizaron sobre placas plásticas estériles de 96 pocillos con tapa (Costar, EE.UU.). En cada una se dispensaron 100 µL/pozo de las diferentes concentraciones de la batería de antifúngicos preparados previamente. Estos se colocaron en las filas desde la A a la G, quedando dispuestos de la mayor a la menor concentración en las columnas de la 1 - 11. La última columna, se destinó para el medio de cultivo libre de antifúngico. Las placas se rotularon y conservaron a -70 °C hasta su utilización

Preparación del inóculo: A partir de cultivos frescos en ADS a 35 °C durante 48 h se prepararon las suspensiones de trabajo como se describe a continuación. Primero, la concentración se ajustó por espectrofotometría (Genesys 20, Países Bajos) a $1-5 \times 10^6$ células/mL. A partir de la misma, se diluyó 1:100 en SSE y esta a su vez 1:20 en

medio RPMI-1640, lo que resultó en $0,5-2,5 \times 10^4$ células/mL. Después de descongelar y atemperar las placas conservadas previamente con las diferentes concentraciones de los antifúngicos, estas se inocularon con 100 μ L/pozo de la suspensión de trabajo de cada cepa (una cepa/placa), exceptuando la fila G.

Controles: En cada determinación se incluyeron los controles de crecimiento (medio de cultivo sin droga en la columna 12) y el de esterilidad (medio de cultivo sin droga y sin inóculo en la fila G). La calidad de cada lote de medio de cultivo se evaluó mediante la ejecución de la técnica con las cepas controles *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (CLSI, 2008a).

Incubación y lectura: Las placas inoculadas se incubaron a 35 °C durante 48 h. Previa agitación mecánica, se realizó la lectura visual y espectrofométrica a 420 nm (Anthos LT III, Austria) y se determinó la CIM, la cual se verificó 24 h después. Esta se definió como la menor concentración del antifúngico donde no se evidenció crecimiento en el caso de la anfotericina B o donde hubo una reducción prominente del mismo (≥ 50 %) con relación al control de crecimiento para el resto de las drogas.

Interpretación de los resultados: Debido a la ausencia de valores interpretativos para las especies del complejo *C. neoformans*, se consideraron como aislamientos resistentes a la anfotericina B cuando la CIM de esta droga fue ≥ 2 μ g/mL (Lozano *et al.*, 1998; Nguyen y Yu, 1998). En cuanto a la 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol se emplearon los criterios establecidos frente a *Candida* spp. (≥ 32 μ g/mL, ≥ 64 μ g/mL y ≥ 1 μ g/mL respectivamente) (CLSI, 2008b).

III.3.2.3.2. Determinación de los perfiles genotípicos

Los perfiles se determinaron mediante tipificación con STR según se describe en III.3.2.2, página 41.

III.3.2.4. Determinación de los patrones de susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos cubanos de *C. neoformans* var. *grubii*

Se incluyeron 163 aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii* (117 de muestras clínicas, 45 de excretas de paloma y una de materia vegetal).

III.3.2.4a. Método de microdilución en medio líquido

Las determinaciones se realizaron según las directrices del documento M27-A3 descrito en III.3.2.3.1, página 43. Además de los antifúngicos que se detallan en el mismo, se emplearon los siguientes:

- Voriconazol (Pfizer): Las soluciones “madres” se prepararon a concentraciones de 0,016 a 8 µg/mL en DMSO y las de trabajo de 0,008 a 4 µg/mL en RPMI-1640.
- Posaconazol (Schering Plough, EE.UU.): Las soluciones “madres” se prepararon a concentraciones de 0,016 a 8 µg/mL en DMSO y las de trabajo de 0,008 a 4 µg/mL en RPMI-1640.
- Isavuconazol (Basilea, Suiza): Las soluciones “madres” se prepararon a concentraciones de 0,004 a 4,00 µg/mL en agua destilada estéril y las de trabajo de 0,002 a 2 µg/mL en RPMI-1640.

Interpretación de los resultados: Hasta el momento no se disponen de criterios interpretativos para posaconazol e isavuconazol. En cuanto a la anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol se emplearon los previamente descritos en III.3.2.3.1, página 43. Por último, se consideraron aislamientos resistentes frente a voriconazol cuando la CIM de esta droga fue ≥ 4 µg/mL frente a los mismos (CLSI, 2008b).

Paralelamente, se utilizó el método de difusión en agar mediante Etest y disco para el fluconazol.

III.3.2.4b. Método de difusión mediante Etest (Pfaller *et al.*, 2003)

Medio de cultivo: Para este ensayo se empleó el medio líquido RPMI-1640 solidificado con 2 % de agar según las especificaciones que se describen en el anexo 4.

Antifúngico: Tiras de fluconazol (0,016-256 µg/mL) (AB Biodisk, Suecia).

Inóculo: Las suspensiones de trabajo se prepararon según se describe en III.3.2.3.1, página 43.

Preparación e inoculación de las placas: Una vez que las placas se atemperaron, con un hisopo estéril embebido en el inóculo, se sembró la superficie del agar en tres direcciones para obtener un crecimiento homogéneo en toda la superficie. Después de 10-15 min, adsorbida la humedad, se colocaron las tiras de Etest con un par de pinzas, apoyando primero sobre el agar la zona de menor concentración de antifúngico.

Incubación y lectura: Las placas se colocaron en cámara húmeda a 35 °C durante 48-72 h. Se estimó como CIM el valor donde el borde de la elipse de inhibición intersectó la escala de concentración de la tira. No se tuvo en consideración la presencia de colonias de menor tamaño dentro del diámetro de la zona de inhibición.

Interpretación de los resultados: Se emplearon los criterios establecidos por el CLSI para el fluconazol frente a *Candida* spp. Se consideraron aislamientos susceptibles cuando la CIM de esta droga fue ≤ 8 µg/mL, susceptibles dependientes de la dosis cuando la CIM se encontró entre 16 y 32 µg/mL y resistentes cuando la CIM fue ≥ 64 µg/mL (CLSI, 2008b).

Controles: La calidad de los lotes de medio de cultivo preparados y de las tiras se evaluó mediante la ejecución de la técnica, utilizando las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

III.3.2.4c. Método de difusión con discos (Meis *et al.* 2002)

Medio de cultivo: Se emplearon placas Petri de 150 mm de diámetro con agar Mueller-Hinton (Difco Laboratories, EE.UU.) suplementado con glucosa al 2 % y azul de metileno (anexo 4).

Antifúngico: Discos de fluconazol (25 µg) (Pfizer).

La preparación de las suspensiones de trabajo, las cepas controles empleadas, la inoculación de las placas y la incubación de las mismas, se realizó según el mismo protocolo descrito para la prueba de difusión en agar con tiras de Etest.

Lectura e interpretación de los resultados: La determinación de los valores de CIM en cada caso se realizó mediante el analizador de imágenes Biomic versión 5,9 (Giles Scientific, EE.UU.) y la interpretación de los mismos se basó en los criterios expuestos en III.3.2.4b, página 46.

Controles: La calidad de los lotes de medio de cultivo preparados y de los discos se evaluó mediante las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

III.3.2.4.1. Análisis estadístico

En cada caso (microdilución en medio líquido y difusión en agar mediante Etest y disco), se calcularon los rangos y las CIM₅₀ y CIM₉₀ frente a las drogas incluidas en el estudio. La comparación de las medias geométricas entre los diferentes grupos de aislamientos se realizó mediante la prueba U de Mann Whitney y la relación existente entre los métodos empleados para el fluconazol a través de la prueba de Kruskal-Wallis.

Se definieron tres tipos de errores de concordancia entre los métodos siguiendo los siguientes criterios de Espinel-Ingroff (Espinel-Ingroff *et al.*, 2007) y las pautas interpretativas reportadas por el CLSI para levaduras (CLSI 2008b).

Errores importantes: No. de aislamientos con $CIM \leq 8 \mu\text{g/mL}$ por el método de referencia y $CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$ por el método evaluado / Total de aislamientos con $CIM \leq 8 \mu\text{g/mL}$ por el método de referencia.

Errores menores: No. de aislamientos con $CIM 16-32 \mu\text{g/mL}$ por el método de referencia y $CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$ por el método evaluado / Total de aislamientos con $CIM 16-32 \mu\text{g/mL}$ por el método de referencia.

Errores muy importantes: No. de aislamientos con $CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$ por el método de referencia y $CIM \leq 8 \mu\text{g/mL}$ por el método evaluado / Total de aislamientos con $CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$ por el método de referencia.

III.4. Consideraciones éticas

En este estudio se emplearon los aislamientos clínicos obtenidos durante el desempeño del laboratorio en las actividades de diagnóstico y referencia. Tanto estos, como los procedentes de las excretas de aves, forman parte de la colección de cultivos de hongos del LMIPK.

Los trabajos que conllevaron recolección de las muestras vegetales se realizaron 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). De esta misma forma, se cumplieron estrictamente las buenas prácticas de laboratorio y todas las medidas de bioseguridad para el trabajo y 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, así como por el Ministerio de Salud Pública de Cuba.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde que Emmons aisló por primera vez este hongo a partir de excretas de palomas mucho se ha aprendido acerca del complejo *C. neoformans* (Emmons, 1955). Entre los principales avances alcanzados se encuentran la descripción de su estado sexual (Kwon-Chung, 1975), la distinción de las variedades y serotipos, su asociación con determinados nichos ecológicos (Emmons, 1955; Ellis 1987; Abegg *et al.*, 2006), la aplicación de las herramientas moleculares en la comprensión de los más diversos aspectos relacionados con las especies de este complejo (Boekhout *et al.*, 2001; Litvintseva *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010) y los estudios de susceptibilidad a los antifúngicos (Rodero *et al.*, 2000). No obstante, algunos aspectos concernientes a su epidemiología y patogenia aún no se encuentran esclarecidos totalmente. En 1967, Pappagianis después de hacer una revisión sobre aspectos epidemiológicos de *C. neoformans* sentenció: "... el prefijo *crypto*-continúa siendo el más apropiado ya que aún se desconocen muchos aspectos sobre este microorganismo..." (Tomado de Casadevall y Perfect, 1998). Más de 40 años después, a pesar de los considerables avances en el conocimiento sobre este agente, la frase no ha perdido vigencia.

Desde que se diagnosticaron los primeros casos de pacientes con sida en Cuba, la criptococosis ha constituido una de las micosis oportunistas que afecta más frecuentemente a los individuos seropositivos al VIH en este país. No obstante, los estudios precedentes son limitados. El presente trabajo da respuesta a algunas de las interrogantes existentes en torno a esta importante entidad y su agente causal.

IV.1. Caracterización taxonómica hasta nivel de serotipo y tipo de apareamiento de los aislamientos cubanos de *Cryptococcus*

IV.1.1. Aislamiento e identificación presuntiva de *C. neoformans* a partir de las fuentes vegetales seleccionadas

De acuerdo a los métodos de identificación convencional empleados, el 18,1 % (60/331) de las fuentes muestreadas arrojaron una o más colonias con características compatibles con las del complejo *C. neoformans*. No obstante, el 30 % de estas, escogidas a partir del criterio de selección durante el aislamiento primario (colonias levaduriformes de aspecto cremoso, de color beige al marrón intenso en AAC) correspondieron con otras especies de levaduras y bacterias.

Estos resultados coinciden con los publicados con anterioridad donde se demuestra que *Trichosporon cutaneum* y otras especies de *Cryptococcus* diferentes del complejo *C. neoformans* 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).

Las especies del complejo *C. neoformans* 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; Lester *et al.*, 2011). Así por ejemplo, la capacidad para sintetizar pigmento a partir de compuestos difenólicos se considera uno de sus marcadores fenotípicos, lo que resulta de gran utilidad en su identificación presuntiva. Esta característica se debe a la presencia de la enzima fenoloxidasa cuya actividad tiene como resultado final la producción de melanina. Esta contribuye a la integridad de la pared celular, enmascara a la levadura al depositarse sobre su superficie con lo cual inhibe la opsonización por anticuerpos específicos, provoca alteraciones en la carga de la superficie celular, interfiere la respuesta linfocitaria, confiere protección contra los procesos oxidativos en el interior de los macrófagos y frente a temperaturas extremas, reduce la susceptibilidad a los agentes antifúngicos y le permite

utilizar eficazmente las catecolaminas presentes a nivel del SNC como fuente de energía lo que favorece la diseminación extrapulmonar. No obstante su función primaria cuando se encuentra en el ambiente se relaciona con la degradación de lignina como fuente de nutrientes, mientras el pigmento sintetizado proporciona tolerancia a los cambios de temperatura y protección contra las radiaciones ultravioletas, los metales pesados y las amebas depredadoras (Quintero *et al.*, 2005; Frases *et al.*, 2007).

A diferencia de otros hongos melanogénicos, el complejo *C. neoformans* requiere de sustratos exógenos para la síntesis de este pigmento, característica empleada en el diseño de gran variedad de medios de cultivo con el objetivo de facilitar la recuperación de este agente a partir de muestras con alto grado de contaminación (Valdés *et al.*, 2003; Tendolkar *et al.*, 2005; Nandhakumar *et al.*, 2006; Pedroso *et al.*, 2007). Entre ellos, el AAC es uno de los más empleados por permitir la detección rápida y fácil de estas especies (Hamasha *et al.*, 2004; Quintero *et al.*, 2005; Randhawa *et al.*, 2005; Randhawa *et al.*, 2006; Kidd *et al.*, 2007). Los estudios de Paliwal y sus colaboradores demostraron que la exclusión de glucosa y creatinina del sustrato, promueve una pigmentación más temprana (Paliwal *et al.*, 1978). Estas observaciones se complementan con lo publicado posteriormente donde se concluye que la fenoloxidasa es reprimida en presencia de glucosa a una concentración ≥ 20 g/L (Frases *et al.*, 2007). Todos estos resultados condujeron al desarrollo del medio AAC simplificado, el cual es más efectivo (Vidotto *et al.*, 2004).

La especie de árbol donde se detectó mayor colonización por levaduras del complejo *C. neoformans* fue en los almendros (38,26 %); en orden de frecuencia le siguieron las casuarinas (27,04 %) y los flamboyanes (22,95 %). Esta constituye la primera vez que se reporta la asociación del hongo estudiado con estos últimos.

Uno de los primeros reportes de aislamiento del complejo *C. neoformans*, fue a partir de una fuente natural (jugo de fruta) (tomado de Casadevall y Perfect, 1998). Sin embargo, transcurrió más de medio siglo antes de que se describiera su asociación con las excretas de palomas y casi otro tanto entre este último hecho y el descubrimiento de su relación con material vegetal (Kwon-Chung *et al.*, 2011).

Eucalyptus camaldulensis es la especie de árbol que más se asocia a aislamientos de estas levaduras (Chowdahary *et al.*, 2011; Kwon-Chung *et al.*, 2011). Esto posiblemente se debe a que desde que Ellis y Pfeiffer reportaron por primera vez la recuperación de *C. gattii* a partir de los mismos, estos han sido uno de los más estudiados. Posteriormente se logró demostrar la presencia del complejo *C. neoformans* 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). No obstante, las investigaciones ambientales precedentes realizadas en el propio LMIPK relacionadas con estas plantas, resultaron infructuosas en este sentido (Fernández, 2001).

Los trabajos realizados en especial por Randhawa y sus colaboradores, demostraron un amplio rango de hospedadores y describieron también su asociación 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.*, 2006; Hiremath *et al.*, 2008; Randhawa *et al.*, 2008; Hagen y Boekhout, 2010; Chowdahary *et al.*, 2011). En relación a los almendros, además de estos reportes existen estudios que demuestran la capacidad de *C. gattii* de sobrevivir en árboles de este tipo por al menos 12 meses, así como su potencialidad de migrar de las plantas infectadas al suelo y en sentido opuesto sin causar daños aparentes en las mismas (Huérffano *et al.*, 2001; Escandón *et al.*, 2002). Basados en estas referencias se seleccionaron los *Ficus* y almendros para el presente estudio; sin embargo, solo se recobraron levaduras con las características de *Cryptococcus* spp. a partir de los últimos.

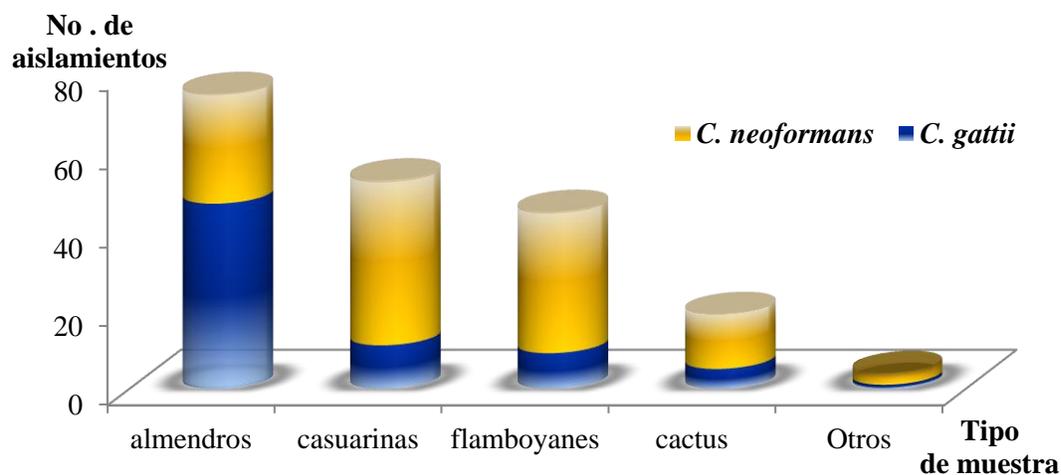
Los cactus, de donde se recuperó casi el 10 % del total de levaduras compatibles con las especies del complejo *C. neoformans*, son de los últimos incorporados a la lista cada vez más larga de donde se ha logrado recuperar este agente fúngico. Su inclusión en este trabajo se basó en el reporte de Loperana *et al* y su abundancia relativa en lugares públicos (Loperana *et al.*, 2010). En contraste, de las restantes 10 especies de plantas estudiadas, solo se obtuvieron aislamientos con las características deseadas a partir de copey, ocuje, roble y pino (una de cada una).

Hoy se considera que las excretas de las aves son “contaminadas” a partir de las levaduras ya existentes en los árboles al encontrar condiciones que favorecen su sobrevivencia y multiplicación (Casadevall y Perfect, 1998). Esta hipótesis surgió al reconocer la especialización del complejo *C. neoformans* en la degradación de compuestos polifenólicos que le sirven de sustrato durante el crecimiento saprofítico basada en la actividad de su enzima fenoloxidasa. Esto sugiere, que el hábitat primario de estas levaduras pudiera encontrarse en la vegetación y sus detritos y que no está asociado con algún tipo de planta en particular (Lazera *et al.*, 2000).

En general, la diferencia de los resultados en cuanto al aislamiento de *Cryptococcus* de las especies de plantas con las que se ha asociado anteriormente, pudiera deberse a dos factores fundamentales. En primer lugar, actualmente el complejo *C. neoformans* ha sido aislado de al menos 50 especies de 17 familias de plantas (Chowdahary *et al.*, 2011; Kwon-Chung *et al.*, 2011); sin embargo, algunas especies de plantas relacionadas en otros trabajos, no se incluyeron en este por no formar parte de la flora cubana y otras (aguacate, mango, tamarindo y cedro fundamentalmente) (Kumar *et al.*, 2009, Chowdahary *et al.*, 2011) por no encontrarse en las áreas muestreadas. En segundo lugar, estos resultados pudieran obedecer a que la presencia de este hongo está gobernada por factores bióticos (competencia con otros microorganismos que pudieran estar presentes) y abióticos (exposición directa a la luz solar, calor excesivo y la desecación por la acción del viento, fundamentalmente), los cuales varían ampliamente en un nicho ambiental dado (Randhawa *et al.*, 2006).

Las investigaciones de ocurrencia y prevalencia de este microorganismo a partir de fuentes ambientales demuestran que ambas especies del complejo *C. neoformans* están presentes tanto en ambientes rurales como urbanos, pero se describe en mayor proporción en estos últimos (Delgado *et al.*, 2005; Quintero *et al.*, 2005; Pedroso *et al.*, 2006; Refojo *et al.*, 2008; Hagen y Boekhout, 2010). Por este motivo la mayoría de los autores eligen para sus trabajos jardines zoológicos, parques y avenidas con gran número y diversidad de ejemplares de árboles (Randhawa *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2005). Guiados por estos antecedentes y debido a las implicaciones que pudiera tener el hallazgo de fuentes naturales de levaduras del complejo *C. neoformans* en estos ambientes (mayor número de personas expuestas), para este

trabajo se trataron de conjugar ambas variables (ambientes urbanos + cantidad y variedad de plantas). Aunque las especies de plantas estudiadas fueron dispares en cada localidad, la identificación presuntiva de los aislamientos primarios arrojó la presencia tanto de *C. gattii* como de *C. neoformans* en las especies de árboles más representados (a excepción de *Ficus* spp.), en especial en los almendros donde se obtuvo el porcentaje más alto del primero y las casuarinas donde predominaron los segundos (figura 2).



	almendros	casuarinas	flamboyanes	cactus	Otros	Total
<i>C. neoformans</i> (CGB negativo)	28 14,28 %	42 21,42 %	36 18,36 %	14 7,14 %	3* 1,53 %	123 (62,75 %)
<i>C. gattii</i> (CGB positivo)	47 23,97 %	11 5,61 %	9 4,59 %	5 2,55 %	1** 0,51 %	73 (37,24 %)
Total	75 (38,26 %)	53 (27,04 %)	45 (22,95 %)	19 (9,69 %)	4 (2,04 %)	196 (100%)

Otros incluye: copey*, ocuje*, roble* y pino**.

Los porcentajes (%) se calcularon en relación al total de plantas estudiadas.

Figura 2. Aislamientos obtenidos a partir de la inoculación de las muestras en ACC y su distribución de acuerdo a las características observadas en medio CGB según el tipo de planta.

El resultado en cuanto al empleo del CGB como método de diferenciación presuntiva entre las especies del complejo *C. neoformans*, mostró que alrededor de un tercio de los aislamientos (73/196) previamente identificados como tal, produjeron reacción positiva

La prueba de crecimiento en este medio de cultivo fue propuesta por Kwon-Chung y sus colaboradores para distinguir las entonces variedades *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii*. Está basado en la resistencia de esta última especie tanto a la L-canavanina como a las bajas concentraciones de cicloheximida y en su capacidad para utilizar la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, lo que provoca acidez del medio y cambio de color del indicador de pH (Kwon-Chung *et al.*, 1982).

Este criterio de diferenciación cuenta con el aval del análisis de múltiples aislamientos obtenidos de muestras clínicas (Lazera *et al.*, 2000; Kidd *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2008). Sin embargo, los estudios a partir de fuentes ambientales muestran una menor especificidad. Otros autores reportan que entre el 30 y el 76 % de otras especies de *Cryptococcus* diferentes del complejo *C. neoformans* son capaces de desarrollar una reacción positiva sobre este agar (Tay *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2009). Debido al riesgo elevado de errores durante la identificación convencional de este patógeno cuando se aísla a partir de muestras ambientales y en particular de material vegetal, se hace necesario su combinación con otros métodos para lograr una mayor certeza del resultado (Leal *et al.*, 2008). En este sentido, los análisis moleculares constituyen una herramienta de utilidad invaluable.

El muestreo de este estudio se realizó mediante hisopados para lo que se escogieron preferentemente ranuras y oquedades con mayor acumulación de materia orgánica en descomposición, capaz de proveer los requerimientos nutricionales básicos para la subsistencia y desarrollo de *Cryptococcus*.

Varios trabajos demuestran la superioridad de este método *versus* los convencionales. Esto quedó demostrado en los trabajos de Randhawa y sus colaboradores quienes lograron la recuperación mediante hisopado del 95 % de *C. neoformans* en contraposición con un 76 % obtenido por el método convencional (Randhawa *et al.*, 2005; Randhawa *et al.*, 2008; Randhawa *et al.*, 2010). Esto pudiera estar asociado a que i) este último parte de la colección del material vegetal, el cual se somete a un proceso de descontaminación laborioso, con menores rendimientos en la recuperación de levaduras; ii) la longitud del hisopo facilita la toma de muestra en el interior de los sitios profundos y angostos donde cabría esperarse mayor densidad de población de *C. neoformans* debido a menor competencia con otros

microorganismos; iii) al mismo tiempo, por ser estos lugares sombríos y húmedos, protegen a las levaduras de factores ambientales que pudieran disminuir sus potencialidades de sobrevivencia o incluso, ser letales (Quintero *et al.*, 2005; Randhawa *et al.*, 2005; Hiremath *et al.*, 2008).

IV.1.2. Caracterización mediante métodos moleculares

El análisis mediante AFLP de los patrones genéticos de los aislamientos de fuentes vegetales obtenidos, mostró 29 agrupaciones. Con la identificación posterior a través de la secuenciación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 / D1-D2 se comprobó que *Cryptococcus heveanensis* resultó la especie más representada (36 %) seguido de *Cryptococcus flavescens* (9 %), *Cryptococcus albidosimilis/liquefaciens* (5 %) y otras especies de levaduras en menor cuantía. Solo uno de ellos (procedente de almendro), correspondió con *C. neoformans* var. *grubii* (figura 3). El análisis para determinar su serotipo y tipo de apareamiento evidenció que se corresponde con A α , mientras que el perfil genético obtenido por tipificación con STR concuerda con el del CM1 (ver más adelante en el acápite IV.2). Por otra parte, se demostró que 65 genotipos congregados en siete de las agrupaciones genéticas posiblemente constituyan nuevas especies.

Hasta el momento no se han recuperado aislamientos de *C. gattii* autóctonos a pesar de que Cuba presenta un clima favorable con abundante y variada vegetación. El aislamiento de otras especies diferentes del complejo *C. neoformans* a partir de las fuentes ambientales vegetales, reafirma la necesidad del empleo de métodos moleculares para confirmar su identificación. Los datos aportados por los reportes revisados sugieren que la presencia de levaduras de dicho complejo no se encuentra restringida a determinadas plantas o zona geográfica; sin embargo, en las áreas muestreadas en este trabajo, no se detectaron ejemplares del resto de las especies vegetales estudiadas por otros autores (Randhawa *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2009; Chowdhary *et al.*, 2011). Este aspecto pudo influir en los resultados encontrados. Finalmente, el hecho de no obtener aislamientos del complejo *C. neoformans*, no excluye su presencia, haciendo necesarios nuevos intentos para su recuperación.

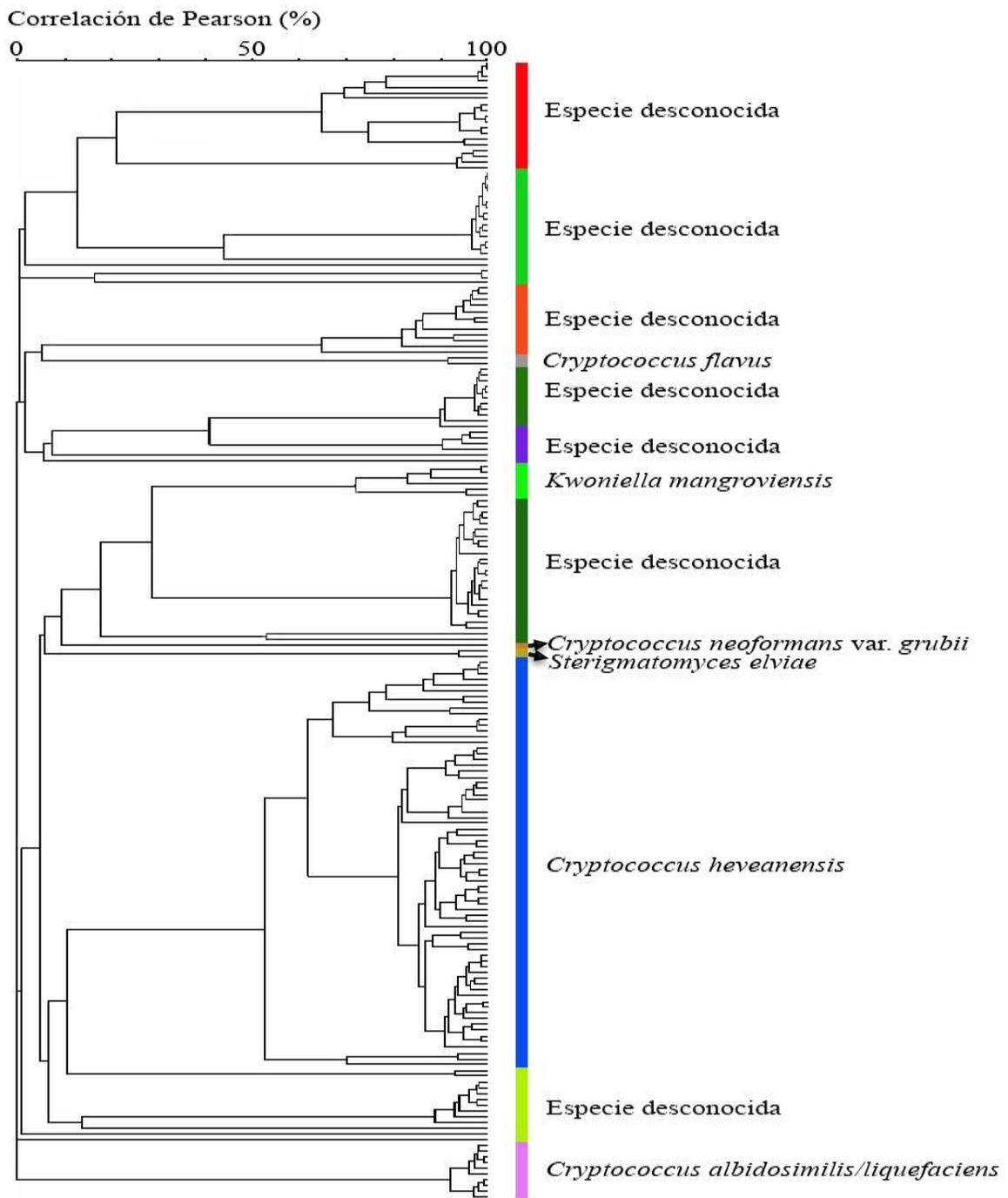
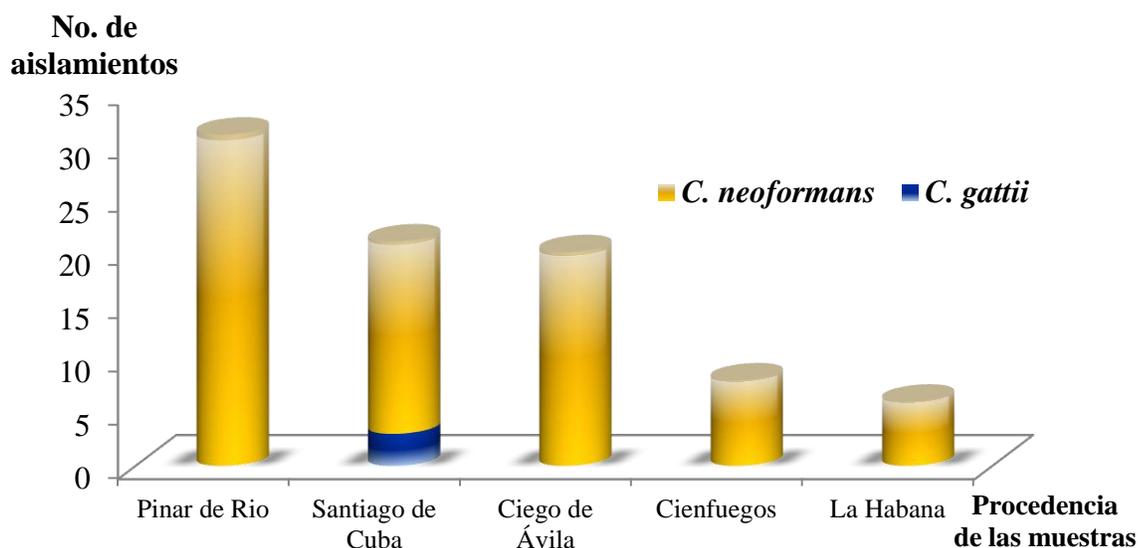


Figura 3. Dendrograma de las huellas genéticas por AFLP de los aislamientos obtenidos a partir de fuentes vegetales identificados previamente como especies del complejo *C. neoformans*. El mismo se construyó según el método de UPGMAN con el empleo del coeficiente de correlación de Pearson. Las principales agrupaciones genéticas y sus correspondientes identificaciones mediante secuenciación de ITS1-5.8S-ITS2 / D1-D2 se encuentran simbolizadas por las barras de diferentes colores.

IV.1.3. Re-identificación de los aislamientos clínicos y de los obtenidos a partir de excretas de palomas. Determinación del serotipo/tipo de apareamiento

Basados en las características de los aislamientos en el medio CGB, el 3,48 % de los obtenidos de excretas de palomas se identificó presuntivamente como *C. gattii*, mientras que los restantes (tanto clínicos como ambientales) correspondieron a *C. neoformans* (figura 4).



	Pinar de Río	Santiago de Cuba	Ciego de Ávila	Cienfuegos	La Habana	Total
<i>C. neoformans</i> (CGB negativo)	31 (36,04 %)	18 (20,93 %)	20 (23,25 %)	8 (9,3 %)	6 (6,97%)	83 (96,5 %)
<i>C. gattii</i> (CGB positivo)	0	3 (3,48 %)	0	0	0	3 (3,48 %)
Total	31 (36,04 %)	21 (24,41 %)	20 (23,25 %)	8 (9,3 %)	6 (6,97 %)	86 (100%)

Figura 4. Número de aislamientos de las excretas de palomas y su distribución de acuerdo al crecimiento o no en el medio CGB según la provincia de procedencia. Los porcentajes se calcularon con relación al total de muestras estudiadas.

Los estudios precedentes de caracterización de aislamientos cubanos de origen humano y ambiental, dieron como resultado un predominio total de *C. neoformans* (Fernández *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1998a; Martínez *et al.*, 2004) a diferencia de lo encontrado en este estudio.

Actualmente, existen numerosas alternativas, incluyendo los métodos moleculares, para la identificación y caracterización del complejo *C. neoformans* a todos los niveles taxonómicos (Casadevall y Perfect, 1998; Katsu *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2010). Los avances alcanzados en este sentido permiten concluir que si bien los serotipos B y C presentan una mayor tendencia a la localización en zonas tropicales y subtropicales, A, D y A/D (especialmente el primero) se encuentran distribuidos en todas las latitudes y constituyen los principales responsables de los aislamientos clínicos y ambientales (Escandón *et al.*, 2006; Lin, 2009).

El dramático incremento de la infección por *C. gattii* tanto en humanos como en animales ocurrido en la costa occidental de Canadá y Estados Unidos de Norteamérica a partir de 1999, demostró la capacidad de adaptación de esta especie y su emergencia en áreas de clima templado (Litvintseva *et al.*, 2005; Refojo *et al.*, 2008; Tay *et al.*, 2008. Macdougall *et al.*, 2011). Hasta el momento, solo existe un reporte de aislamiento de *C. gattii* en Cuba obtenido de secreciones respiratorias de un guepardo (*Acinonyx jubatus*) del Zoológico Nacional. No obstante, los estudios realizados, apuntan hacia la posibilidad de que el animal haya arribado a la instalación con una infección latente eventualmente adquirida en Sudáfrica, lugar de procedencia (Polo *et al.*, 2010; Illnait *et al.*, 2011b).

El análisis genotípico del conjunto de aislamientos estudiados mediante AFLP demostró la presencia de 16 patrones únicos y siete conglomerados (figura 5A). La posterior secuenciación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 / D1-D2 permitió corroborar la identificación de los especímenes CGB negativos como *C. neoformans* var. *grubii* lo que confirma la prevalencia de esta especie en Cuba. Así mismo, se pudo determinar que los presumiblemente reconocidos como *C. gattii*, pertenecían a la especie *C. laurentii*.

El AFLP es uno de los métodos moleculares más empleados en la caracterización de *Cryptococcus* debido a sus múltiples ventajas. Entre estas, especificidad y poder resolutivo elevados, así como gran capacidad para detectar variabilidad genética al explorar la presencia o ausencia de polimorfismo en los fragmentos restringidos.

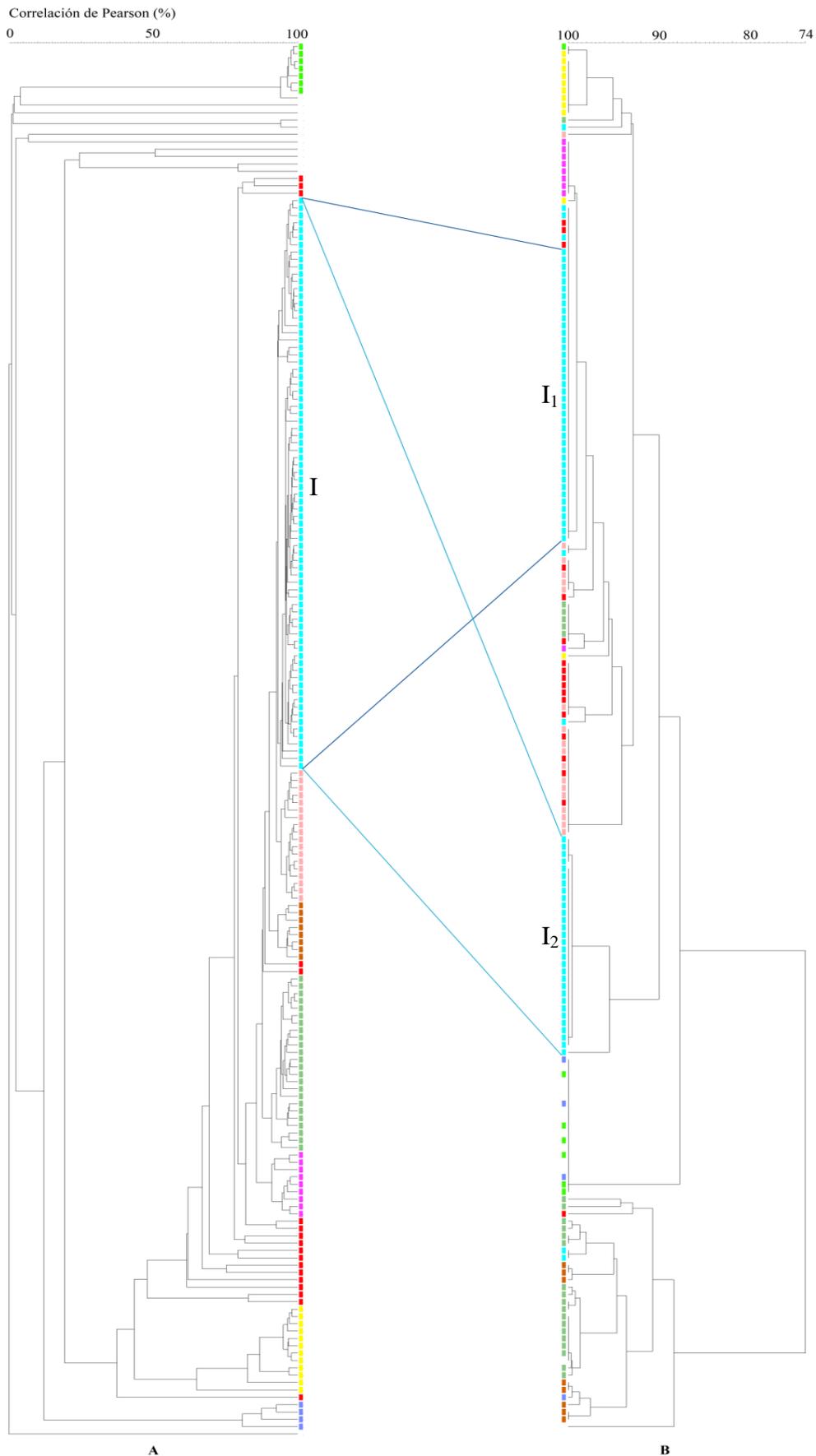


Figura 5. Correlación entre los patrones genéticos obtenidos mediante AFLP (A) y tipificación con STR (B). Los dendrogramas se construyeron según el método de UPGMAN con el empleo del coeficiente de correlación de Pearson. Los colores distinguen las agrupaciones obtenidas mediante AFLP. Hubo correlación total entre ambas técnicas en la discriminación de la agrupación representada en amarillo. La agrupación de mayor tamaño obtenida mediante AFLP (I) quedó dividida, básicamente en dos cuando se realizó la tipificación con STR (I₁ y I₂). Los restantes aislamientos quedaron dispuestos de forma arbitraria

Basado en los patrones obtenidos con esta técnica, las especies del complejo *C. neoformans* se clasificaron en ocho tipos moleculares (AFLP1, AFLP1A, AFLP1B, AFLP2 al AFLP6) (Boekhout *et al.* 2001). Estos demostraron buena correlación con los derivados del análisis mediante PCR-fingerprinting (VNI al VNIV y VGI al VGIV), con los serotipos descritos previamente (Barreto de Oliveira *et al.*, 2004; Enache-Angoulvant *et al.*, 2007; Leal *et al.*, 2008) y más recientemente también fueron asociados a diversos patrones de virulencia. Esto último se evidenció a través de estudios en modelos murinos los cuales demostraron que determinados genotipos (Ej. AFLP5 correspondiente a VGIIa, b y c) ocasionan mayor letalidad en los animales de experimentación (Fraser *et al.*, 2005; Byrnes *et al.*, 2009, Litvintseva y Mitchell, 2009). Estos a su vez, muestran valores de CIM más elevados frente a diversos antifúngico (Hagen *et al.*, 2010a; Iqbal *et al.*, 2010). Estos hallazgos de laboratorio se encuentran en correspondencia con el cuadro clínico-epidemiológico actual en la costa occidental Canadá y EE.UU. donde las autoridades de salud han alertado sobre la emergencia de un brote causado por dichos genotipos. El mismo se inició desde finales de la década de 1990 y desde entonces ha afectado a cerca de 300 personas y también a animales, los cuales suelen presentar cuadros clínicos más tórpidos con pobre respuesta al tratamiento (Byrnes *et al.*, DeBess *et al.*, 2010; 2010; Galanis *et al.*, 2009; Galanis *et al.*, 2010). No obstante, esta técnica presenta entre sus principales limitaciones, además de la compleja interpretación de los resultados, el gran número de fases que conlleva el proceso, la cantidad de reactivos y equipamiento requeridos, así como la demanda de ADN de alta calidad, factor crucial para el éxito de la misma (Mueller y Wolfenbarger, 1999; Klaassen, 2009; Costa *et al.*, 2010).

Una de las últimas alternativas aplicadas al análisis de la epidemiología molecular del complejo *C. neoformans* es el MLST. Recientemente, el grupo de trabajo de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal dedicado a la caracterización genética de esta levadura, propuso como norma el estudio por este método de los *loci* CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5, y IGS1 (Meyer *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos demostraron ser altamente reproducibles y concisos, pero el costo de la técnica y su complejidad son muy elevados (de Valk *et al.*, 2009; Klaassen, 2009).

Por su parte la secuenciación genómica, a pesar de que fue descrita desde los años '70 del siglo pasado, no se aplicó a los estudios del complejo *C. neoformans* hasta mediados de 1990, dando una nueva perspectiva a los laboratorios en torno a la identificación, los análisis de microevolución, virulencia y epidemiología (Pryce *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010).

Las secuencias conservadas de las regiones repetitivas del genoma constituyen dianas atractivas para los métodos de identificación basados en los PCR dado que la presencia de sus múltiples copias incrementa la proporción de los mismos. Dichas regiones deben contener secuencias especie-específica y de forma yuxtapuesta, secuencias conservadas únicas, de manera que la compilación de fragmentos permita la identificación tanto de género como de especie en un PCR simple (Golubev y Sampaio, 2009).

La región ITS (incluyendo el gen 5.8S del ARNr) es la región más empleada en la identificación molecular para agentes fúngicos debido a su alto grado de variabilidad (Hsu *et al.*, 2003; Katsu *et al.*, 2004). La secuenciación de los dominios D1/D2 del *locus LSU* del ADNr 26S fue recomendada posteriormente con este propósito por la confiabilidad probada de sus resultados. La región ITS es en general, más variable que D1/D2 y los especímenes de una misma especie pudieran diferir por múltiples discordancias a nivel de la primera (Golubev y Sampaio, 2009). En este trabajo se combinó la secuenciación de ambos fragmentos para garantizar una mayor veracidad de los resultados y facilitar la comparación con las secuencias publicadas. Esta tecnología resulta altamente atractiva pero costosa y solo se lleva a cabo en laboratorios de referencia o grandes laboratorios de asistencia médica (Klein *et al.*, 2009).

Los estudios moleculares que se realizaron en este trabajo para determinar el tipo de apareamiento demostraron que todos los aislamientos identificados previamente como *C. neoformans* var. *grubii* son portadores del alelo *MAT α* (*C. neoformans* A α).

En condiciones de poca disponibilidad de nutrientes, baja humedad y temperaturas entre 15-33 °C, pudiera ocurrir apareamiento o reproducción sexual de este basidiomiceto. Este proceso da como resultado la liberación de basidiosporas, más pequeñas que las células vegetativas las que son fácilmente dispersadas por el viento a diferentes nichos ecológicos, incluyendo al hombre (Lin *et al.*, 2008; Velagapudi *et al.*, 2009). Este sistema de

apareamiento es controlado por un *locus* con dos alternativas alélicas: *MATa* y *MATα* (Feng *et al.*, 2008; Metin *et al.*, 2010). La posibilidad de poder determinarlos resulta de gran utilidad en los estudios sobre la ecología, la epidemiología, la patogenicidad, así como la clínica de la criptococosis y su agente causal.

Existen evidencias de que durante el entrecruzamiento genético, ambos alelos son segregados en igual proporción (Metin *et al.*, 2010). Sin embargo, reportes previos muestran que *MATα* está presente en los aislamientos clínicos y ambientales en una proporción muy superior al *MATa* (30:1). Este hecho sugiere que *MATα* presenta ciertas ventajas selectivas para la supervivencia (Matsumoto *et al.*, 2007; Hiremath *et al.*, 2008).

Recientemente, se comprobó que la reproducción es posible tanto entre células del tipo de apareamiento opuesto como del mismo sexo. Es posible que el *locus MATα* sea el principal responsable de la reproducción entre organismos del propio tipo y la fructificación haploide en *C. neoformans*. En la actualidad existen evidencias sobre esto en aislamientos de los serotipos A y D obtenidos de fuentes naturales (Boekhout *et al.*, 2001; Saul *et al.*, 2008; Kozubowski y Heitman, 2011). Esta forma de reproducción constituye un potenciador de la variación genética en las poblaciones naturales de los organismos. La diversidad resultante puede aumentar la eficacia de selección natural y realzar la oportunidad de colonizar satisfactoriamente nuevos ambientes (Matsumoto *et al.*, 2007; Hiremath *et al.*, 2008; Metin *et al.*, 2010). Paralelamente, estudios de infección experimental empleando ambas formas sexuales indican que las células *MATα* son más virulentas al ocasionar infección diseminada al sistema nervioso central con mayor frecuencia en relación a las del *MATa* (Litvintseva *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2008).

En síntesis, el hallazgo de que todos los especímenes clínicos y más del 95 % de los obtenidos a partir de excretas de palomas correspondan a *C. neoformans* var *grubii* (ser. A), confirma los resultados anteriores sobre el predominio de este en Cuba (Fernández *et al.*, 1998a) y en el mundo (Lin *et al.*, 2008; Kozubowski y Heitman, 2011). Esta constituye la primera vez que se determina el tipo de apareamiento de los aislamientos cubanos de *C. neoformans* y se demuestra que el 100 % de los mismos pertenecen al *MATα*, lo que constituye una evidencia más de su alta prevalencia tanto en la naturaleza como en las muestras clínicas. Así mismo, los intentos de aislamientos de las especies de este complejo a

partir de material vegetal apuntan hacia la pertinencia de confirmar la identificación convencional a través de métodos moleculares y a la necesidad de nuevos ensayos ampliados a otras especies de plantas y regiones del país dada la baja prevalencia encontrada de estas levaduras en las fuentes estudiadas.

IV.2. Determinación de las posibles fuentes de infección por *Cryptococcus* a través de la comparación de los patrones genéticos de aislamientos clínicos y ambientales

Los nueve marcadores seleccionados a partir de la secuencia de la cepa tipo H99, resultaron polimórficos al mostrar entre 5 y 51 alelos diferentes por cada uno (tabla 5). Los mismos mostraron alta especificidad para *C. neoformans* var. *grubii* al no obtener productos de amplificación después de aplicar ADN de las cepas controles *C. neoformans* serotipo D (CBS10511), *C. gattii* serotipo B (CBS6956) y *C. gattii* serotipo C (CBS 10101).

Tabla 5. Número de alelos detectados por los marcadores de cada subpanel.		
Subpanel	Marcador	No. de alelos (rango)
CNA2	CNA2a	15 (10-60)
	CNA2b	6 (8-21)
	CNA2c	16 (8-44)
CNA3	CNA3a	9 (19-69)
	CNA3b	5 (5-17)
	CNA3c	10 (8-38)
CNA4	CNA4a	51 (15-119)
	CNA4b	10 (5-25)
	CNA4c	11 (1-18)

En la tabla 6 se expresa el cálculo del poder discriminatorio de cada uno de los marcadores analizados de forma individual y del conjunto (superior a 0,99). Los de mayor variabilidad correspondieron con CNA2c y CNA4a. Si bien la eliminación de este último resultó en una reducción de aproximadamente el 50 % del número de genotipos, esto no afectó la distribución de los mismos en los grupos encontrados. Contrariamente, el 85 % del total de los especímenes no produjo amplificación con el marcador CN3a. Esto pudiera ser el

resultado de: i) la delección de este *locus* en el genoma de los aislamientos estudiados, ii) la presencia de una o más secuencias polimórficas de los dos cebadores de amplificación, iii) o alternativamente, a que el tamaño de los fragmentos amplificados pudiera encontrarse fuera de los límites de la talla de los marcadores de la corrida de electroforesis capilar, lo cual no fue posteriormente investigado. En todo caso, la exclusión de este marcador no influyó la agrupación de los aislamientos en los diferentes grupos.

Tabla 6. Poder discriminatorio basado en el índice de diversidad de Simpson (D) de cada uno de los marcadores, de cada panel de marcadores y del juego completo de marcadores (Simpson, 1949).					
Marcador	D	Panel	D	Juego	D
CNA2a	0,842	CNA2	0,906	CNA	0,993
CNA2b	0,789				
CNA2c	0,828				
CNA3a	0,282	CNA3	0,868		
CNA3b	0,618				
CNA3c	0,819				
CNA4a	0,972	CNA4	0,992		
CNA4b	0,712				
CNA4c	0,688				

En el 2008 Hanafy y sus colaboradores reportaron el uso de microsatélites para los estudios de tipificación de *C. neoformans* var. *grubii*. Sin embargo, de los 15 marcadores empleados solo tres mostraron ser polimórficos. Adicionalmente, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, técnica que presenta menor resolución y no permite aprovechar las potencialidades de los microsatélites como dianas de la tipificación (Hanafy *et al.*, 2008).

En su conjunto, el panel seleccionado para este trabajo permitió discernir en la colección analizada (190 aislamientos) 104 genotipos diferentes distribuidos en 20 genogrupos. La relación entre los mismos se ilustra en la figura 6. Varias de dichas agrupaciones quedaron separadas por diferir en el número de marcadores y fueron designadas como CM.

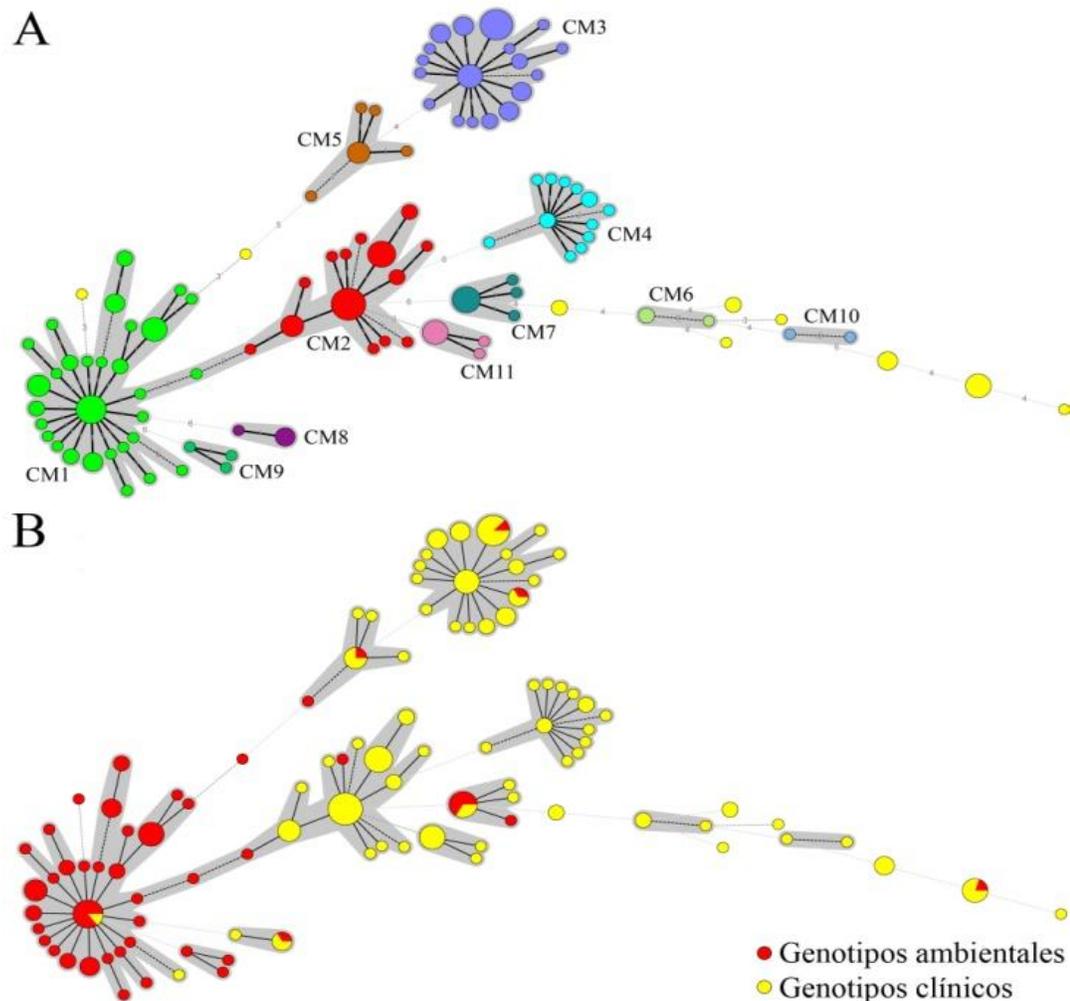


Figura 6. Origen de los aislamientos y su relación con los genotipos.

A) Expansión mínima del árbol basado en el análisis multiestatal de categorías. Cada círculo representa un genotipo único; el tamaño de los círculos corresponde con el número de aislamientos con ese genotipo. Cada genotipo se encuentra interconectado por una línea con el (los) genotipo(s) más cercano(s). Los grupos constituidos por dos o más genotipos cuya variabilidad fue atribuible solamente a uno o dos marcadores fueron designados como complejo de microsatelite (CM) y se representaron con colores diferentes; los círculos amarillos constituyen genotipos únicos y no forman parte de ningún CM.

B) El mismo árbol de expansión mínima mostrando el origen (clínico o ambiental) de los genotipos.

Aunque CM1 y CM2 se encuentran conectados entre sí por genotipos que solo difieren en dos marcadores, existe una evidente separación entre ambos, por lo que se consideraron como complejos no relacionados (figura 6, tabla 7). De esta forma, se identificaron 11 CM y nueve grupos genéticos constituidos por 18 aislamientos que no quedaron incluidos en ninguno de los complejos. Los análisis evidenciaron que más del 70 % de todos los especímenes quedaron congregados en cuatro de los 11 CM.

Tabla 7. Distribución de los aislamientos según su origen en los complejos de microsatélites.					
Complejo	No. total de aislamientos	Aislamientos de origen ambiental	Aislamientos de origen clínico		
			VIH positivos	VIH negativos	Condición desconocida
CM1	51	49	2	0	0
CM2	32	2	16	6	8
CM3	39	2	27	9	1
CM4	14	0	14	0	0
CM5	8	2	5	0	1
CM6	3	0	0	3	0
CM7	9	5	4	0	0
CM8	4	1	3	0	0
CM9	3	3	0	0	0
CM10	2	0	1	1	0
CM11	7	0	4	1	2
Otros	18	4	9	5	0
Total	190	68	85	25	12

La distribución temporal de CM3, el cual abarcó el mayor número de aislamientos clínicos ($n = 37$), demostró la presencia de este genotipo a lo largo de casi dos décadas. Por su parte, CM4, CM6, CM10 y CM11 estuvieron constituidos exclusivamente por especímenes clínicos procedentes de pacientes VIH positivos el primero, VIH negativos el segundo y ambos tipos de pacientes en los dos últimos. De esta observación se pudiera deducir la presencia de nichos ecológicos adicionales de *C. neoformans* var. *grubii* como posibles

fuentes de infección en humanos y la posible existencia de genotipos más virulentos capaces de afectar de forma eventual a pacientes sin factores predisponentes conocidos (CM6). Por su parte, los análisis considerando la provincia de origen de los pacientes y la fecha de obtención del aislamiento no arrojaron datos de interés, al encontrarse distribuidos de forma arbitraria en los diferentes grupos.

De forma llamativa, CM1 quedó constituido mayormente por aislamientos de origen ambiental (96 %) y tuvo una amplia representación de todos los puntos muestreados a lo largo de Cuba; diferencia que fue altamente significativa ($p < 0.001$). Por su parte, aunque de menor tamaño, CM9 quedó compuesto exclusivamente por especímenes de este mismo origen.

C. neoformans var. *grubii* tradicionalmente se asocia con las excretas de palomas y el suelo contaminado con estas. Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica, las personas con sistema inmune debilitado deben evitar el contacto con las aves, especialmente las palomas y sus desechos (Disease Listing, 2009). No obstante, la diversidad de los aislamientos ambientales solo se conoce parcialmente. En este sentido solo se conocen unos pocos estudios comparativos entre las huellas genéticas obtenidas de especímenes recuperados de muestras clínicas y ambientales de una misma área geográfica, los cuales sugieren una estrecha relación entre los mismos (Boekhout *et al.*, 2001; Trilles *et al.*, 2003; Litvintseva *et al.*, 2005). A pesar de esto, muchos aspectos relacionados con la estructura de esta población, tales como: ¿cuáles genotipos son más propensos a causar infección? ¿qué relación temporal o espacial existe entre otros? permanecen bajo interrogantes.

Aunque se realizó una cuidadosa selección de colonias a partir de las muestras ambientales, no se puede descartar la posibilidad de sesgo relacionado con la presencia de determinados genotipos más frecuentes en las excretas de palomas. Sin embargo, el hallazgo de complejos constituidos únicamente o en su mayoría por aislamientos ambientales, hace suponer el origen clonal de los mismos y que estos se encuentran mejor adaptados al microambiente de donde fueron recuperados. Estas inferencias necesitan ser confirmadas mediante estudios de patogenicidad.

Los patrones obtenidos mediante AFLP se emplearon para evaluar el resultado derivado del uso del panel de marcadores seleccionados. Aunque un número relativamente pequeño de

aislamientos clínicos (11 %) quedó indiscutiblemente separado en una agrupación, subdivisión totalmente compatible con CM4, el resto se distribuyó en los demás CM de forma indistinta. De manera general, al compararlo con la tipificación con STR, el AFLP puso de manifiesto una menor variabilidad genética en esta colección y no fue capaz de evidenciar segregación entre los aislamientos clínicos y ambientales (figura 5 A y B). Estos resultados confirman la utilidad del panel de marcadores propuesto como dianas en la tipificación molecular de *C. neoformans* var. *grubii*.

El AFLP es una técnica molecular que se basa en la amplificación de fragmentos de múltiples lugares del genoma (Vuylsteke *et al.*, 2007). Este principio permite inferir que las diferencias genéticas encontradas entre los especímenes que integran CM1 y los restantes, son relativamente pequeñas, contrarias a las diferencias sustanciales observadas entre la mayoría de los aislamientos y aquellas pertenecientes a CM4. Probablemente, su poder discriminatorio pudiera incrementarse mediante el empleo de otras combinaciones de enzimas de restricción y residuos selectivos.

Los estudios relativamente recientes de Litvintseva *et al.* con la aplicación del AFLP como técnica de caracterización, demostraron mayor diversidad genética entre los aislamientos clínicos que entre los ambientales (Litvintseva *et al.*, 2005), por lo que los hallazgos obtenidos mediante la tipificación con STR en el presente trabajo son consistentes con los reportados por esta autora.

Otros métodos moleculares de tipificación tales como el cariotipaje, la amplificación al azar de ADN polimórfico mediante reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR, de sus siglas en inglés) y el MLST se han empleado en los estudios del complejo *C. neoformans* (Blasi *et al.*, 2001; Litvintseva *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010). Zhu *et al.*, en una investigación publicada con posterioridad a este trabajo, comparan 83 aislamientos clínicos y 53 ambientales procedentes de Brasil mediante el empleo de MLST y concluyen que los principales genogrupos clínicos difieren de los ambientales, por lo que la relación entre ambos no es tan estrecha como se suponía hasta la fecha (Zhu *et al.*, 2010). Tanto estos autores como Litvintseva *et al.* al realizar ensayos de virulencia *in vivo*, demostraron que los especímenes de fuentes ambientales son menos patogénicos (Litvintseva *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010). Estos resultados y los obtenidos de la comparación de aislamientos

clínicos y ambientales cubanos brindan solidez a las inferencias derivadas de este estudio y al empleo de la tipificación con STR como método de caracterización genética.

En síntesis, los resultados de este trabajo confirman la utilidad del panel de marcadores propuesto para la tipificación molecular de *C. neoformans* var. *grubii*, los cuales permiten distinguir los especímenes clínicos de los ambientales. La ausencia de variabilidad temporo-espacial entre la mayoría de los aislamientos ambientales (>70 %) sugiere una relación clonal de los mismos lo que pudiera deberse a las características geográficas de Cuba en su condición de isla. En contraste, a pesar de que la mayoría de los aislamientos clínicos provenían de Ciudad de La Habana y La Habana, estos se encontraron distribuidos en varios de los CM. Estas evidencias sugieren que la infección humana por *C. neoformans* ocurre a partir de nichos ecológicos adicionales diferentes a los incluidos en este estudio. La interpretación de estos resultados ofrece una nueva perspectiva a la epidemiología de la criptococosis y su agente causal en Cuba con implicaciones que pudieran ir más allá de sus fronteras.

IV.3. Susceptibilidad antifúngica y genotipificación de aislamientos consecutivos recuperados de pacientes con meningitis criptocócica recurrente

Los resultados del análisis de los 19 especímenes obtenidos de siete pacientes con meningitis criptocócica recurrente durante el período pre-TARVAE mostraron una media de aislamiento/paciente de 2,71 (rango 2-4) y un tiempo promedio entre la recuperación de cada uno de ellos de 52,5 días (rango 13-123). A excepción del paciente No. 7 todos eran seropositivos al VIH y tuvieron un desenlace fatal a causa de la micosis a pesar de recibir tratamiento antifúngico según se recoge en la tabla 4.

La criptococosis es una enfermedad rara en individuos inmunocompetentes, lo que indica que un sistema inmune totalmente efectivo puede controlar la infección. No obstante, la modulación de la respuesta innata adaptativa pudiera promover la supervivencia de algunas levaduras en estos individuos (Chen *et al.*, 2008). Sumado a esto, la emergencia de resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un problema creciente añadiendo un

nuevo mecanismo a la persistencia de este patógeno (Spitzer *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 2004; Bii *et al.*, 2007; Olszewski *et al.*, 2010).

Los cuadros de meningitis criptocócica persistente o recurrente son descritos con relativa frecuencia a pesar de administrar el tratamiento de elección (Jarvis *et al.*, 2007; Olszewski *et al.*, 2010). Los resultados de los estudios publicados al respecto son variables. La mayoría de los autores sugieren que este fenómeno pudiera deberse a recaídas de la infección por la cepa infectante original (Mondon *et al.*, 1999; Friese *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2005), otros lo atribuyen a una disminución de la susceptibilidad a los antifúngicos (Rodero *et al.*, 2000) o a un deterioro progresivo del sistema inmune (Casadevall *et al.*, 1993; Casadevall y Perfect, 1998). Por su parte, las infecciones mixtas y la microevolución de la cepa original son consideradas con menos frecuencia (Sullivan *et al.*, 1996; Blasi *et al.*, 2001; Litvintseva *et al.*, 2005). Hasta el momento no se habían realizado en Cuba estudios de aislamientos secuenciales de *C. neoformans* obtenidos de pacientes con cuadros recurrentes o persistentes.

El régimen de antifúngicos recomendado para el tratamiento de la neurocriptococosis incluye tres fases: inducción, consolidación y mantenimiento. La combinación de anfotericina B y 5-fluorocitosina en la primera, seguido del uso del fluconazol en las dos últimas, es la más asociada al éxito terapéutico (Perfect *et al.*, 2010). A pesar de que el itraconazol resulta menos efectivo en la terapia anticriptocócica, la presencia de intolerancia a las drogas de elección o la carencia de las mismas, justifican su empleo. Este medicamento también se recomienda como alternativo en la profilaxis de la infección en los pacientes con alto riesgo (Sarl *et al.*, 2004; Fusco-Almeida *et al.*, 2007; Perfect *et al.*, 2010). De acuerdo con estas pautas y con los esquemas administrados a los pacientes incluidos en este estudio, se seleccionaron las drogas para la determinación de la susceptibilidad antifúngica *in vitro*.

Los datos al respecto, resultantes del análisis de los aislamientos incluidos en el presente estudio se reflejan en la tabla 8. El valor más alto de CIM obtenido para anfotericina B fue de 0,25 µg/mL y solo se detectó diferencia de una dilución entre algunos de los aislamientos secuenciales.

Tabla 8. Susceptibilidad <i>in vitro</i> a los antifúngicos empleados durante el tratamiento de los pacientes según el método de microdilución en medio líquido.					
Paciente No.	Aislamiento No.	Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g/mL}$) lectura a las 72 h			
		Anf B	5FC	Flu	Itr
1	08360992	0,125	8	4	0,125
	08360975	0,25	2	4	0,063
	08361001	0,25	4	4	0,25
2	08360997	0,125	2	1	0,031
	08360970	0,25	2	2	0,063
	08360991	0,125	1	1	0,031
3	08360971	0,25	2	2	0,063
	08360972	0,125	8	2	0,125
4	08360982	0,25	2	2	0,031
	08360989	0,25	1	4	0,031
5	08360924	0,25	2	1	<0,016
	08360925	0,25	1	0,25	0,031
6	08361056	0,125	0,5	0,25	<0,016
	08361052	0,125	0,5	4	0,125
	08361053	0,25	1	8	0,125
7	08360926	0,25	0,5	0,5	<0,016
	08360930	0,25	0,5	0,5	0,031
	08360978	0,125	1	1	0,031
	08360942	0,25	4	8	0,5
Rango		0,125-0,25	0,5-8	0,25-8	0,016-0,5
MG		0,2	2,09	2,51	0,051
CIM ₅₀		0,25	2	2	0,031
CIM ₉₀		0,25	4	4	0,125
<p>Anf B = anfotericina B; 5FC = 5-fluorocitosina; Flu = fluconazol; Itr = itraconazol MG = Media geométrica CIM₅₀ = Mínima concentración del antifúngico capaz de inhibir al 50 % de la cepa en comparación con el control de crecimiento CIM₉₀ = Mínima concentración del antifúngico capaz de inhibir al 90 % de la cepa en comparación con el control de crecimiento</p>					

Debido a la ausencia de puntos de corte para este polieno frente a levaduras del complejo *C. neoformans*, se asumieron los reportados previamente en 1998 por Nguyen y Yu y Lozano *et al.* Estos autores definen un aislamiento como resistente cuando la CIM de la droga supera los 2 µg/mL debido a su asociación con el fracaso terapéutico (Lozano *et al.*, 1998; Nguyen y Yu, 1998). Los resultados obtenidos fueron similares a los publicados anteriormente donde se reportan valores uniformes de CIM y ausencia de resistencia frente a la anfotericina B (Fernández *et al.*, 1998b; Pfaller *et al.*, 2004; Messer *et al.*, 2009).

La 5-fluorocitosina, a pesar de mostrar un máximo de variación entre el total de los aislamientos de hasta cuatro diluciones, los valores de CIM no excedieron los 8 µg/mL. No se encontraron especímenes resistentes al aplicar los criterios interpretativos del CLSI, donde se consideran como aislamientos resistentes frente a esta droga, cuando la CIM de la misma es ≥ 32 µg/mL (CLSI, 2008b).

Tanto el itraconazol como el fluconazol mostraron los rangos más amplios (hasta cinco diluciones); este último además presentó CIM elevadas (hasta 8 µg/mL). A pesar de la eficacia *in vivo* del fluconazol, trabajos anteriores han demostrado la baja actividad *in vitro* de este medicamento frente a *C. neoformans* (Aller *et al.*, 2000). De acuerdo con estos autores, los buenos resultados terapéuticos obtenidos son en gran parte atribuibles a las altas concentraciones que logra alcanzar en el LCR. Aunque todos los aislamientos se consideraron sensibles (CMI < 64 µg/mL), se observó un incremento escalonado de cinco y cuatro diluciones en los pacientes No. 6 y 7 respectivamente (tabla 8), lo que apunta hacia una disminución progresiva de los niveles de sensibilidad a esta droga (Mondon *et al.*, 1999; Perfect *et al.*, 2010).

Si bien algunos autores plantean que el amplio uso del fluconazol en los pacientes inmunodeprimidos ha contribuido al desarrollo de resistencia (tasas entre 4-16 % en Asia y hasta del 40 % en Norteamérica y Europa) (Fusco-Almeida *et al.*, 2007), las cifras obtenidas en este trabajo son comparables a las publicadas anteriormente, las cuales muestran que el 100 % de los aislamientos fueron susceptibles a esta droga (Fernández *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 2004; Messer *et al.*, 2009).

De forma general, la actividad del itraconazol frente a los aislamientos secuenciales incluidos en este estudio mostraron un rango de 0,016-0,5 µg/mL por lo que todos se consideraron susceptibles según los criterios establecidos por el CLSI (CLSI 200b). Los valores de media geométrica (0,051 µg/mL) así como las CIM₅₀ (0,31 µg/mL) y CIM₉₀ (0,125 µg/mL) son similares a los reportados por Dannaoui *et al.* y otros autores (Sabatelli *et al.*, 2006; Messer *et al.*, 2009; Dannaoui *et al.*, 2010). Solo los pacientes No. 2 y 7 recibieron tratamiento con este antifúngico, sin embargo, en más del 70 % de los mismos, se detectó incremento de los valores de CIM de itraconazol de hasta cinco diluciones; esto pudiera obedecer a un mecanismo de resistencia cruzada entre los azoles (Fusco-Almeida *et al.*, 2007). Estos resultados reafirman la importancia de mantener una estrecha vigilancia de la susceptibilidad a los antimicrobianos.

El empleo del panel de marcadores previamente descritos, para la caracterización molecular mediante STR, permitió la detección de la variabilidad genética entre los especímenes. Este análisis evidenció la presencia de 14 patrones genéticos; solo dos de los pacientes, con dos y tres aislamientos respectivamente, presentaron patrones idénticos, en tanto que para el resto (14 aislamientos) la técnica demostró la presencia de diferentes genotipos (figura 7).

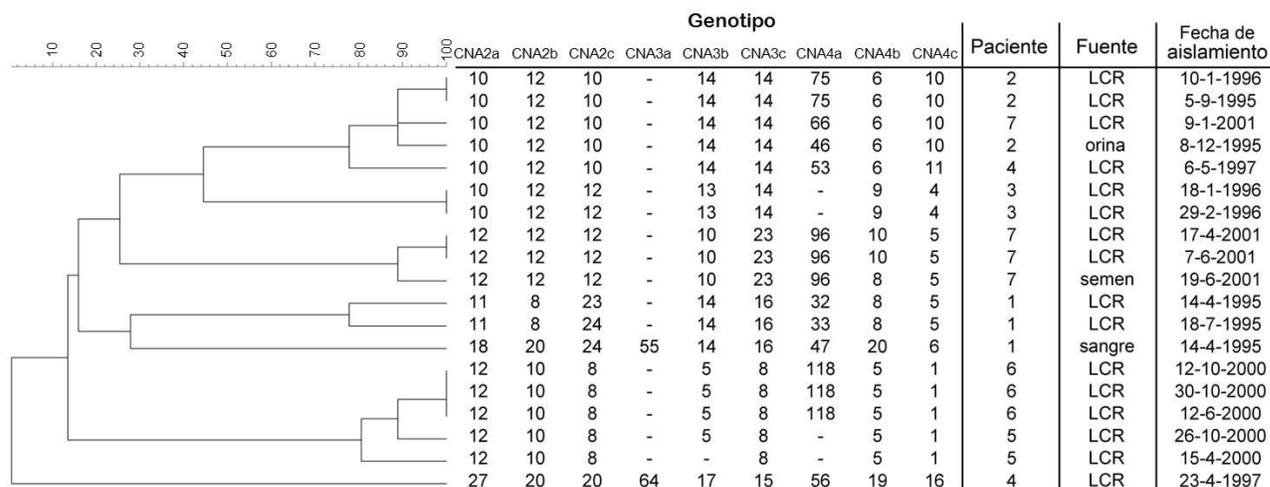


Figura 7. Relación entre los diferentes genotipos de los 19 aislamientos de *C. neoformans* obtenidos de siete pacientes por tipificación con STR. Los números de cada columna de genotipo corresponden al número de repeticiones observadas con cada marcador. El guión indica que no se obtuvo resultado. El dendrograma está basado en el análisis de agrupamiento de UPGMAN con el empleo del coeficiente de correlación de Pearson. La escala indica el porcentaje de similitud.

El conocimiento de la patobiología de los microorganismos, especialmente su interrelación con el hospedador, resulta de gran importancia en el desarrollo de estrategias que mejoren los efectos clínicos de los tratamientos y limite la persistencia de los agentes en los tejidos. Motivados por esto, algunos investigadores han estudiado los posibles mecanismos que intervienen en la relación entre el agente y el humano durante la infección criptocócica (Lin *et al.*, 2008; Casadevall, 2010; Guerrero *et al.*, 2010; Olszewski *et al.*, 2010).

La tipificación mediante STR se ha utilizado poco en la caracterización de aislamientos de *Cryptococcus*; sin embargo, su aplicación en este trabajo confirmó su eficacia para este propósito. Otros métodos de tipificación, especialmente el cariotipaje electroforético, el RAPD-PCR, el RFLP y el MLST se emplearon en análisis epidemiológicos similares con los cuales se obtuvieron resultados divergentes (Sullivan *et al.*, 1996; Fusco-Almeida *et al.*, 2007). No obstante, la mayoría de los resultados obtenidos indican que la infección recurrente en los pacientes estudiados fue causada por la persistencia de la cepa original.

Los primeros estudios de cariotipaje y RFLP realizados en series de aislamientos recuperados de pacientes con sida en Nueva York demostraron la similitud entre los mismos para cada uno de los individuos incluidos en el ensayo (Spitzer *et al.*, 1993). Un trabajo posterior empleando la misma técnica de caracterización pero aplicada a *C. neoformans* obtenidos de pacientes con sida de Uganda, evidenció que los aislamientos secuenciales fueron idénticos o muy similares en 12 de los 17 pacientes estudiados (Pfaller *et al.*, 1998).

Del paciente N° 1 se obtuvieron dos aislamientos iniciales, uno a partir de sangre y otro de LCR. Ambos mostraron perfiles de susceptibilidad similares, sin embargo resultaron ser genotípicamente diferentes. Dado que estos se aislaron al mismo tiempo, se pudiera deducir que el paciente estaba infectado con ambos genotipos en el momento de la primera toma de muestra. Después de más de tres meses de terapia de mantenimiento con fluconazol, el paciente fue readmitido debido a la recaída de los signos y síntomas. El aislamiento obtenido a partir del LCR en ese momento mostró un genotipo diferente en comparación con los anteriores. Estos resultados sugieren dos posibilidades: i) el paciente había sido re-infectado con un nuevo genotipo durante la terapia de mantenimiento o ii) el aislamiento inicial persistente había sufrido una microevolución genética.

Los pacientes N° 2 y N° 5 presentaron tres y dos aislamientos respectivamente, los cuales mantuvieron patrones de susceptibilidad similares a lo largo del tiempo. En el primer caso, solo los obtenidos a partir del LCR mostraron igual patrón genético de lo que se infiere que el paciente pudo tener una infección simultánea con más de un genotipo. Debido a la similitud morfológica de las colonias, solo una del crecimiento obtenido de cada muestra se seleccionó para su conservación, lo cual constituye una limitación de este estudio ya que colonias con morfología similar pudieran ser genéticamente diferentes como fue demostrado en este trabajo y en otros llevados a cabo con anterioridad (Desnos-Ollivier *et al.*, 2010). Este hecho contribuye a que las infecciones mixtas sean inadvertidas.

En el paciente No. 5, los aislamientos solo diferían en un marcador y por tanto se consideró que pudieran estar genéticamente relacionados. Estas observaciones sugieren la posibilidad de micro-evoluciones de *C. neoformans* durante la infección humana, proceso que permitiría a la población de hongos modificarse y escapar de su eliminación por la acción del sistema inmunológico y cursar de forma crónica (Jain *et al.*, 2005).

Por otra parte, el paciente N° 4 se encontraba infectado con dos genotipos totalmente diferentes. Debido al corto tiempo que medió entre cada aislamiento, se infiere que esta no se tratara de una infección recurrente, sino que el paciente se encontraba infectado de forma simultánea con ambos especímenes, coincidentemente con perfiles de susceptibilidad muy similares. Situación totalmente inversa se observó en los aislamientos obtenidos del paciente N° 6 (genotípicamente idénticos) para los cuales se demostró incremento progresivo de los valores de CIM frente a los antifúngicos estudiados, especialmente para el fluconazol.

A pesar de la terapia antifúngica administrada, el LCR del paciente N° 7 permaneció positivo durante más de cinco meses al examen microscópico (nigrosina) y cultivo. Solo el segundo y tercer aislamientos, obtenidos con un intervalo de 52 días entre sí, mostraron el mismo patrón genético. Por su parte, la homología entre el tercero y el cuarto aislamiento con un intervalo de solo 13 días fue del 90 % y entre el primero y el último (intervalo de 164 días) del 34 %. Esto podría explicarse por (i) la infección simultánea con más de un aislamiento, (ii) la re-infección con un aislamiento nuevo durante el tratamiento, (iii) al desarrollo de cambios genéticos a través del tiempo como mecanismo de adaptación al hospedador o (iv) la combinación de todos estos factores. Estas hipótesis son apoyadas por

el hallazgo del incremento evidente en los valores de CIM frente al fluconazol e itraconazol del último aislamiento.

En síntesis, los resultados mostrados sugieren que la recurrencia de la infección en la mayoría de estos pacientes no estuvo asociada a la resistencia a los medicamentos, sino probablemente a la co-infección con diferentes aislamientos o variedades genéticamente modificadas. Esta constituye una evidencia más sobre la capacidad de *C. neoformans* de experimentar transformaciones que le permitan evadir las defensas del hospedador lo que contribuye a su supervivencia.

IV.4. Determinación de los patrones de susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos cubanos de *C. neoformans* var. *grubii* frente a los antifúngicos de primera línea en el tratamiento de la criptococosis y otros azoles

IV.4.1. Determinación los patrones de susceptibilidad *in vitro* mediante el método de microdilución en medio líquido

Los resultados obtenidos de la actividad *in vitro* mediante microdilución en medio líquido de los siete antifúngicos probados, se muestran en la tabla 9. Considerados en conjunto, estos exhibieron patrones uniformes de susceptibilidad, con los valores más altos y los rangos más amplios frente a la 5-fluorocitosina (0,063-64 µg/mL) y el fluconazol (0,25-64 µg/mL); mientras que los más bajos correspondieron al isavuconazol, posaconazol y voriconazol (en orden creciente).

Aunque la mayoría de los trabajos precedentes se basaron en el estudio de un número más reducido de especímenes, las cifras obtenidas aquí frente a los principales antifúngicos son similares a los ya publicados tanto en Cuba como internacionalmente (Fernández *et al.*, 1998b; Fernández *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 2004).

IV. Resultados y Discusión

Tabla 9. Susceptibilidad *in vitro* mediante microdilución en medio líquido de aislamientos de *Cryptococcus* frente a siete antifúngicos de acuerdo al origen de la cepa y la presencia o no de infección por VIH en los pacientes.

Origen (No.)	Antifúngico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
		Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Ambientales (46)	Anf B	0,016-0,5	0,25	0,5
	5FC	0,5-64	4	8
	Flu	0,25-64	4	8
	Itr	0,0016-0,5	0,063	0,25
	Vor	0,0016-0,25	0,063	0,25
	Pos	0,0016-0,125	0,31	0,63
	Isa	0,002-0,0031	0,004	0,016
VIH positivos (85)	Anf B	0,031-1	0,25	0,25
	5FC	0,125-8	4	8
	Flu	0,25-8	2	4
	Itr	0,0016-0,5	0,031	0,25
	Vor	0,0016-0,25	0,031	0,125
	Pos	0,0016-0,125	0,031	0,016
	Isa	0,002-0,063	0,008	0,016
VIH negativos (32)	Anf B	0,125-1	0,25	1
	5FC	0,063-8	2	4
	Flu	0,25-8	2	8
	Itr	0,016-0,5	0,031	0,063
	Vor	0,016-0,25	0,063	0,063
	Pos	0,016-0,5	0,063	0,125
	Isa	0,004-0,063	0,008	0,031
Subtotal (117)	Anf B	0,031-1	0,25	0,25
	5FC	0,063-8	4	8
	Flu	0,25-8	2	4
	Itr	0,016-0,5	0,031	0,25
	Vor	0,016-0,25	0,031	0,125
	Pos	0,016-0,5	0,004	0,016
	Isa	0,002-0,063	0,004	0,016
Total* (163)	Anf B	0,016-1	0,25	0,25
	5FC	0,063-64	4	8
	Flu	0,25-64	2	4
	Itr	0,016-0,5	0,031	0,25
	Vor	0,016-0,25	0,031	0,125
	Pos	0,002-0,125	0,004	0,016
	Isa	0,002-0,063	0,004	0,016

Anf B: anfotericina B; 5FC: 5-fluorocitosina; Flu: fluconazol; Itr: itraconazol; Vor: voriconazol; Pos: posaconazol; Isa: isavuconazol; (No.): número de aislamientos incluidas en cada categoría CIM₅₀ y CIM₉₀: Concentración mínima del antifúngico capaz de inhibir al 50 y 90 % de la cepa en comparación con el control de crecimiento

* El número total de aislamientos estuvo restringido a los que se encontraban disponibles en el momento del estudio.

La elevada incidencia de infecciones micóticas en los individuos seropositivos al VIH y el empleo del fluconazol en las terapias tanto profilácticas como de mantenimiento a largo plazo, ha incrementado el temor justificado sobre la emergencia de resistencia a los azoles de manera general (Souza *et al.*, 2005). Ante esta situación, la Organización Mundial de la Salud hizo un llamado a mantener la vigilancia sobre este fenómeno (Bii *et al.*, 2007). Sin embargo, los estudios precedentes realizados en este sentido en Cuba estuvieron restringidos a un menor número de especímenes (no más de 43) y de antifúngicos (anfotericina B y fluconazol) (Fernández *et al.*, 1998b; Fernández *et al.*, 1999).

La finalidad de estas pruebas es, de manera general, facilitar la toma de decisiones en cuanto a la política de antibióticos a seguir frente a un determinado agente y en lo particular, predecir el efecto clínico del tratamiento y poder seleccionar las drogas o las combinaciones de estas con mayor actividad. En los últimos años se han realizado considerables esfuerzos para lograr métodos eficaces y reproducibles; sin embargo, los datos disponibles sobre la susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans* son limitados y contradictorios, lo que dificulta el establecimiento de los puntos de cortes para este microorganismo (Larsen *et al.*, 2005).

A pesar de que el uso clínico de la anfotericina B se ve obstaculizado por su nefrotoxicidad, esta se emplea con gran éxito para tratar infecciones por diferentes levaduras y hongos filamentosos (Chen *et al.*, 2007). Los valores de CIM encontrados para esta droga, fueron superiores en los aislamientos de pacientes VIH negativos en comparación con los portadores del virus. No obstante, todos resultaron ser susceptibles teniendo en cuenta los parámetros previamente descritos en este trabajo. Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura donde el número de *C. neoformans* resistentes a este polieno es sorprendentemente bajo, hecho atribuido en parte, a la carencia de una metodología eficaz y reproducible para su determinación (Nguyen y Yu, 1998; Lozano *et al.*, 1998).

El documento M27-S3 recomienda que se consideren aislamientos resistentes a la 5-fluorocitosina cuando la CIM de esta droga es $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ frente a los mismos (CLSI, 2008b). Bajo este criterio, todos los especímenes clínicos estudiados fueron susceptibles y solo tres de procedencia ambiental revelaron cifras superiores. Esta es una

droga con espectro de acción limitado que incluye *Candida* spp. y el complejo *C. neoformans* (Chen *et al.*, 2007). Su asociación con la anfotericina B es preconizada como terapia de elección en el tratamiento de ataque de la meningitis criptocócica (Perfect *et al.*, 2010). La mayor eficacia de dicha combinación comparada con el uso del polieno como única droga, quedó demostrada ampliamente tanto en los individuos VIH positivos como negativos (Dorsthorst *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2007). En este trabajo, la resistencia encontrada fue menor a la reportada previamente por otros autores (> 20 %) (Bii *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2007); no obstante, los estudios de posibles mecanismos de resistencia y sinergismo serían de gran utilidad en la interpretación de los resultados del presente estudio.

Entre los azoles, el fluconazol mostró la menor actividad. Como se comentó en la sección IV.3, a pesar de su eficacia *in vivo*, trabajos anteriores demostraron su baja actividad *in vitro* frente a *C. neoformans* (Aller *et al.*, 2004; Sarl *et al.*, 2004). Los aislamientos ambientales incluidos en este estudio resultaron menos susceptibles que los clínicos, mientras que los obtenidos de individuos VIH negativos mostraron CIM₉₀ menor en comparación con los de pacientes con sida. Aunque otros factores diferentes a la resistencia antifúngica, como son el 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, algunos autores reportan casos de evidente asociación entre valores elevados de CIM para el fluconazol y el fracaso con el empleo de esta droga (Yildiran *et al.*, 2002).

Entre los especímenes estudiados, solo uno (de procedencia ambiental) presentó CIM = 64 µg/mL. Este hallazgo concuerdan con otros publicados anteriormente donde se reportan rangos de 0,5-64 µg/mL para aislamientos ambientales de *C. neoformans* frente a esta droga en Brasil, Puerto Rico, India y Kenya (Moraes *et al.*, 2002; Pedroso *et al.*, 2006; Bii *et al.*, 2007). Al respecto, Mondon *et al.* sugieren la hipótesis de que la resistencia al fluconazol (CIM ≥ 64 µg/mL) en esta levadura pudiera aparecer con una frecuencia variable, así como que la misma es innata y no se relaciona con exposición previa a los azoles ni a ningún otro antifúngico (Mondon *et al.*, 1999). No obstante, otros hechos comprobados tales como, el fenómeno de heterorresistencia (Mondon *et al.*, 1999; Varma y

Kwon-Chung, 2010) y la resistencia cruzada con azoles de uso agrícola (Serflin *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007) pudieron influir en los resultados obtenidos. Ante esta situación, se impone seguir prestando atención a la emergencia de resistencia a este fármaco debido a su uso generalizado tanto en los pacientes con sida como en seronegativos al VIH (Cuenca-Estrella, 2010).

Los valores de CIM de itraconazol (0,016 - 0,5 µg/mL) exhibieron gran variabilidad independientemente de la procedencia de los aislamientos estudiados. De acuerdo a los criterios interpretativos adoptados en este trabajo, ninguno de los especímenes se consideró resistente al mismo. Aunque algunos autores reportan cifras de resistencia entre el 8 y el 16 % (Tay *et al.*, 2006; Perkins *et al.*, 2005), nuestros resultados concuerdan con otros trabajos donde se declaran altos porcentajes de susceptibilidad a este antifúngico (Moraes *et al.*, 2002; Bii *et al.*, 2007; Chong *et al.*, 2010). A pesar de tener un espectro de acción más amplio y mayor actividad *in vitro* que el fluconazol, el itraconazol ha demostrado ser menos efectivo en el tratamiento de la neurocriptococosis debido a que no logra alcanzar niveles suficientemente altos en el LCR (Cuenca-Estrella, 2010). No obstante, se recomienda como tratamiento alternativo cuando se presenta intolerancia a las drogas de primera línea o no se dispone de estas últimas (Perfect *et al.*, 2010).

Afortunadamente, el arsenal antifúngico se ha incrementado durante las últimas dos décadas con la adición de varios agentes y se espera que en breve se autoricen nuevos triazoles con actividad *in vitro* frente a esta levaduras (Chen *et al.*, 2007; Messer 2009; Cuenca-Estrella, 2010).

En este estudio, el voriconazol demostró una actividad *in vitro* más potente que el itraconazol frente a la selección de aislamientos estudiados. Aunque la efectividad de esta droga frente a *C. neoformans* no se ha estudiado suficientemente, parece ser eficiente incluso frente aquellos especímenes resistentes al fluconazol (Lozano *et al.*, 1998; Perfect *et al.*, 2003; Pfaller *et al.*, 2004; Sabatelli *et al.*, 2006) lo cual queda corroborado por los resultados de la presente investigación. De otra parte, los trabajos en animales de experimentación demuestran que el voriconazol es bien absorbido y alcanza concentraciones altas y prolongadas en suero. Esta farmacocinética favorable pudiera explicar los mejores resultados observados en ratas infectadas tratadas con voriconazol

versus itraconazol (Perfect *et al.*, 2003). Estos resultados prometedores se deberán complementar mediante ensayos clínicos teniendo en cuenta la tendencia al desarrollo de resistencia cruzada entre los azoles (Mondon *et al.*, 1999; Yildiran *et al.*, 2002; Cuenca-Estrella, 2010).

Posaconazol e isavuconazol pertenecen a la última generación de los azoles investigados actualmente por su papel en el tratamiento de infecciones graves por hongos filamentosos y levaduras. Los resultados de susceptibilidad en este trabajo frente al primero, reafirman los reportes anteriores y brindan un soporte teórico a su empleo como nueva alternativa terapéutica en el manejo de la criptococosis. Además de su potente actividad, se tolera bien, ofrece un perfil de toxicidad menor en comparación con otros antimicóticos sistémicos comercializados actualmente y su farmacocinética se caracteriza por la lenta eliminación, bajo aclaramiento plasmático y una extensa distribución tisular (Odds *et al.*, 2006; Ullmann *et al.*, 2006; Schmitt-Hoffmann *et al.*, 2006a; Schmitt-Hoffmann *et al.*, 2006b). Posaconazol además, es el azol de más amplio espectro licenciado hasta la fecha y aunque no se dispone de formulación intravenosa, los estudios tanto en animales como en humanos demuestran seguridad y eficacia comparables a las del fluconazol. Otros autores confirmaron su utilidad en el tratamiento de agentes causales de infecciones sistémicas graves como *Candida* spp., *C. neoformans*, *Aspergillus* spp., *Fusarium solani*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis* lo cual acentúa su valor (Herbrecht *et al.*, 2005; Ullmann *et al.*, 2006).

Aunque tanto el voriconazol como el posaconazol mostraron una potente actividad antifúngica *in vitro* frente a los aislamientos cubanos, isavuconazol exhibió los niveles más bajos de CIM. Este profármaco, precursor de triazol soluble en agua, se encuentra disponible para la administración oral e intravenosa (Odds *et al.*, 2006; Schmitt-Hoffmann *et al.*, 2006a; Schmitt-Hoffmann *et al.*, 2006b). Trabajos similares, reflejan su amplio espectro frente a los principales hongos patógenos (Odds *et al.*, 2006; Seifert *et al.*, 2007) pero el presente estudio constituye la primera evaluación de su acción frente a *Cryptococcus*. Los resultados indican que este antifúngico es el más efectivo en términos de actividad *in vitro* en comparación con los restantes empleados, lo que lo convierte en

una opción atractiva que pudiera adicionarse al arsenal terapéutico para el manejo de la meningitis criptocócica.

Con el objetivo de facilitar la consistencia de los resultados inter-laboratorios, el CLSI desarrolló y publicó las guías para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos mediante el método de microdilución en medio líquido, el cual constituye la técnica de referencia recomendada hasta la fecha (CLSI, 2008a). Debido a que la misma resulta altamente laboriosa y prolongada, se han desarrollado otros métodos alternativos en los últimos años. En este sentido, estudios previos sugirieron que la prueba de Etest y de difusión en disco pudieran ser una opción útil por su fácil realización y no requerir soporte tecnológico adicional (Thompson *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009).

IV.4.2. Determinación de los patrones de susceptibilidad *in vitro* mediante los métodos de difusión en agar Etest y disco para fluconazol y su correlación con los resultados obtenidos por microdilución en medio líquido

En la figura 8 se muestran los valores acumulativos de CIM de fluconazol obtenidos mediante los métodos de difusión en agar (Etest y disco) en comparación con el de referencia (microdilución en medio líquido). El análisis de los datos demostró que la diferencia existente entre ambos fue estadísticamente significativa para $p \leq 0,05$.

De forma general, se encontró que los valores de CIM₅₀ y la media geométrica expresados tanto por los aislamientos de origen clínico como ambiental, fueron muy similares por los tres métodos. Sin embargo, la CIM₉₀ alcanzada mediante Etest, exhibió un valor hasta ocho veces superior al encontrado por el método de referencia para los de procedencia ambiental y hasta seis para los de origen clínico. Este mismo hecho puede constatarse al comparar los valores de CIM₉₀ entre los aislamientos obtenidos de pacientes con y sin sida, siendo más elevados (hasta ocho veces) en estos últimos (tabla 10).

IV. Resultados y Discusión

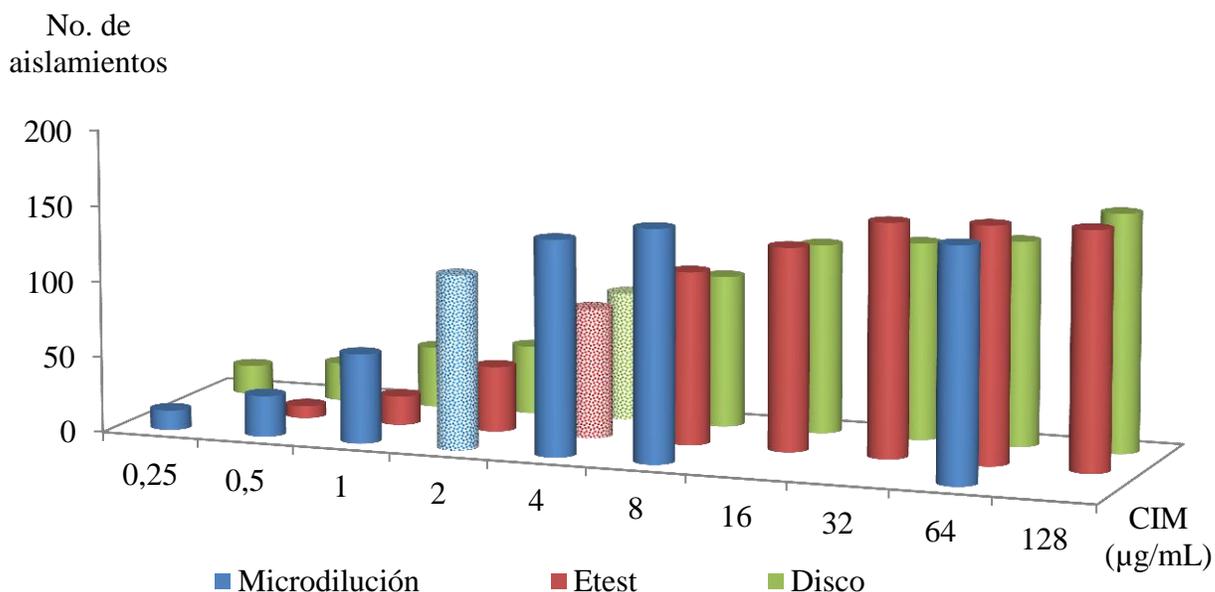


Figura 8. Distribución de los valores acumulativos de CIM de fluconazol obtenidos por microdilución en medio líquido, Etest y disco. Las columnas con trama corresponden a la CIM₅₀ alcanzada con cada método.

Tabla 10. Resultados de CIM (µg/mL) frente al fluconazol mediante microdilución en medio líquido, Etest y difusión en disco de los aislamientos cubanos de *C. neoformans* var. *grubii*.

	Microdilución			Etest			Disco (25 µg)		
	Ambientales	Clínicas VIH+ VIH-		Ambientales	Clínicas VIH+ VIH-		Ambientales	Clínicas VIH+ VIH-	
CIM ₅₀	2	2	2	2	4	4	3	2,4	2,4
CIM ₉₀	4	4	4	24	24	32	11	11	17
Rango	0,25-64	0,25-8	0,25-8	0,016-64	0,5-128	2-32	0,25-165	0,25-47	0,24-47
MG	2	2	2	4	2	4	2	3	2,4
Moda	2	2	2	4	2	4	8	3	2

CIM₅₀ y CIM₉₀: Concentración mínima del antifúngico capaz de inhibir al 50 y 90 % de la cepa en comparación con el control de crecimiento respectivamente

MG: Media geométrica

El amplio uso del fluconazol, especialmente en los individuos VIH positivos, pudiera generar una presión selectiva en el surgimiento de hongos menos sensibles a este antifúngico. Esto ha motivado gran preocupación por conocer la susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans* frente a este azol (Aller *et al.*, 2004; Sarl *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2005, Cuenca-Estrella, 2010). Sin embargo, la comparación de los valores de CIM por diferentes métodos resulta complicado debido a las diferencias entre los mismos en cuanto a las condiciones recomendadas por cada fabricante (inóculo, medio de cultivo, temperatura, tiempo y condiciones de aireación durante la incubación, carga de antifúngico empleada y puntos de corte) (Moraes *et al.*, 2002; Dannaoui *et al.*, 2010).

El Etest parece ser preciso en la determinación de la CIM en numerosos microorganismos, incluyendo bacterias exigentes y algunos agentes fúngicos como *Candida*, al reportarse niveles de concordancia entre 70-90 % con relación a la microdilución en medio líquido (Favel *et al.*, 2000). No obstante, estos resultados son muy variables en dependencia del agente infeccioso y el antimicrobiano evaluado. Dannaoui *et al.*, al estudiar la susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans*, reportaron una correspondencia inferior al 40 % frente a la 5-fluorocitosina y al 60 % para el itraconazol con relación al método de referencia. (Dannaoui *et al.*, 2010). Un trabajo similar realizado por Moraes *et al.*, al comparar la CIM cuatro antifúngicos incluyendo el fluconazol, frente a aislamientos de ambas especies del complejo *C. neoformans* tanto de origen clínico como ambiental, mostró diferencias significativas entre los dos métodos empleados independientemente del origen del hongo (Moraes *et al.*, 2002).

La experiencia en la interpretación de las zonas de inhibición resulta un aspecto crítico en la determinación de la CIM frente al fluconazol y otros azoles independientemente del método de difusión en agar utilizado (Vandenbossche *et al.*, 2002). No obstante, a pesar de su elevado costo, el Etest se recomienda para la determinación de la CIM durante la rutina de los laboratorios con alta carga de trabajo, en tanto que el empleo de discos es más sencillo y económico y la lectura automatizada con el auxilio del Biomic resulta de gran ayuda en la interpretación de los resultados. Para los laboratorios de más bajos recursos, la factibilidad de este se ve favorecida por el desarrollo de curvas de correlación pre-

establecidas entre los diámetros de inhibición y los valores de CIM (Espinel-Ingroff, 2006; Espinel-Ingroff *et al.*, 2007).

Aunque los valores de susceptibilidad obtenidos tanto por el Etest como por disco mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) con relación al método de referencia, pensamos que los métodos de difusión son una alternativa de gran utilidad al no detectarse errores correspondientes a la máxima categoría (tabla 11).

Tabla 11. Evaluación de la concordancia entre los métodos de difusión en agar con relación al de referencia (microdilución en medio líquido) teniendo en cuenta los criterios interpretativos adoptados.						
Método	No. de aislamientos según los criterios interpretativos asumidos			Errores de concordancia con relación al método de referencia (%)		
	S	SDD	R	Muy importantes	Importantes	Menores
Microdilución	161	0	1			
Etest	132	27	3	0	0,8	0,8
Disco	147	12	3	0	0,9	0,8

Los trabajos precedentes publicados, si bien muestran datos muy similares a los obtenidos en el presente estudio, el número de aislamientos de *C. neoformans* evaluados no sobrepasa los 20 (Vandenbossche *et al.*, 2002; Espinel-Ingroff, 2006; Espinel-Ingroff *et al.*, 2007) por lo que estos resultados pudieran constituir un importante soporte para análisis posteriores.

El elevado consumo de tiempo y la mayor laboriosidad generados durante el desarrollo de la microdilución en medio líquido, hacen de esta una técnica poco factible para los laboratorios de diagnóstico con elevada carga de trabajo. Sumado a esto, las discrepancias encontradas entre los métodos evaluados y el de referencia, no afectan la detección de aislamientos resistentes por los primeros. Estos hechos justifican el empleo de los métodos de difusión en agar durante la rutina de los laboratorios en la vigilancia de la aparición de *C. neoformans* resistentes al fluconazol. No obstante, la confirmación de estos casos se debe realizar mediante el método de microdilución en medio líquido en laboratorios de

referencia. Así mismo, una vez normalizados los puntos de corte para esta levadura según el método empleado, dichas discrepancias pudieran reducirse al mínimo.

Los datos brindados en este trabajo proveen una nueva base para la comparación de los perfiles de susceptibilidad de *C. neoformans* según las condiciones de ensayo conforme a las normas del CLSI, así como con los métodos alternativos de difusión en agar estudiados y pudieran servir como punto de referencia para otros estudios similares.

DISCUSIÓN GENERAL

Actualmente el género *Cryptococcus* incluye alrededor de un centenar de especies; no obstante, el complejo *C. neoformans* es el más asociado a enfermedades en humanos (Fonseca *et al.*, 2011). El conocimiento cada vez más profundo de estas levaduras ha permitido distinguir la presencia de dos especies que comprenden cinco serotipos y diversos grupos genéticos (Bovers *et al.*, 2008a; Bovers *et al.*, 2008b). Estos aspectos, aunque básicos, son de vital importancia para la comprensión de la enfermedad desde todos los puntos de vista y permiten a su vez, un mejor manejo de la misma.

La historia natural de la infección por las especies del complejo *C. neoformans* se encuentra bien documentada. A pesar de existir reportes ocasionales de casos de hasta 22 años de evolución, la misma conduce inexorablemente a la muerte cuando no se administra el tratamiento adecuado de forma oportuna. Aun así, una vez iniciados los síntomas, el 86 % de los pacientes con meningitis criptocócica muere durante el primer año y el 70 % en los primeros tres meses (Casadevall y Perfect, 1998; Friedman *et al.*, 2005). Estas cifras alarmantes sobre el pronóstico pobre de la enfermedad, se agravan aún más al conocer que el estimado anual de su incidencia supera el millón de casos (Park *et al.*, 2009). Estos antecedentes y la relativa carencia de estudios básicos sobre esta levadura en Cuba, motivaron la realización de este trabajo.

Hasta el momento, los intentos de caracterización de los aislamientos cubanos de *Cryptococcus* tanto procedentes de muestras clínicas como ambientales, se encontraban restringidos a los estudios convencionales y la tipificación serológica mediante el juego comercial Crypto Check Iatron para un número limitado de especímenes. El intercambio

con el CBS y el CWZ permitió dar un paso de avance en este sentido. De esta forma se logró i) la re-identificación de todos los especímenes autóctonos de este género aislados en el LMIPK, los cuales pertenecen a la colección de hongos del laboratorio, ii) la determinación del tipo de apareamiento mediante métodos moleculares de todos los aislamientos pertenecientes al complejo *C. neoformans*, iii) la determinación de los patrones genotípicos mediante técnicas de alta resolución y iv) conocer la susceptibilidad a los antifúngicos empleados en la primera línea de tratamiento así como a otros azoles de más reciente generación. Estos criterios se emplearon para el análisis comparativo entre los aislamientos según su origen (de procedencia clínica *versus* los obtenidos a partir de muestras ambientales) y entre aquellos de pacientes con cuadros de neurocriptococosis recurrente. De forma adicional, se evaluaron dos métodos de difusión en agar (Etest y discos) para la determinación de la susceptibilidad al fluconazol; con este objetivo se tomaron como referencia los valores de CIM obtenidos mediante microdilución en medio líquido.

La re-identificación mediante AFLP y secuenciación de los fragmentos ITS1/5.8S/ITS2 y D1-D2 de aquellos aislamientos pertenecientes a la colección de hongos del LMIPK (obtenidos a partir de muestras clínicas humanas y excretas de palomas) permitió confirmar el predominio de *C. neoformans* var. *grubii* en Cuba. Hasta el momento el único reporte de *C. gattii* en este país es el proveniente de un guepardo, el cual probablemente era portador de una infección latente adquirida en Sudáfrica, lugar desde donde fue importado el animal (Polo *et al.*, 2010; Illnait *et al.*, 2011b). Esta especie de levadura suele afectar con mayor frecuencia a individuos inmunocompetentes, por lo general requiere tratamientos más prolongados, se asocia a una pobre respuesta terapéutica así como al desarrollo de complicaciones neurológicas y a elevada mortalidad (Kozubowski y Heitman, 2011; Kwon-Chung *et al.*, 2011; Marr *et al.*, 2011). En torno a esta especie, cada vez existe un mayor número de evidencias que apuntan hacia la relación existente entre el desarrollo de la infección y la visita a áreas donde se reporta mayor incidencia de esta micosis (García-Hermoso *et al.*, 1999; Hagen *et al.*, 2010b). Teniendo en cuenta estos hechos, el conocimiento aportado por el presente estudio es de importancia ya que permite

predecir el cuadro clínico-epidemiológico así como la posible respuesta al tratamiento de la criptococosis en Cuba.

Por primera vez que se determinó el tipo de apareamiento de los aislamientos cubanos de *C. neoformans* var. *grubii*. Los datos aportados demuestran que el 100 % de los mismos pertenecen al *MAT α* , lo que constituye una evidencia más de su alta prevalencia a nivel mundial independientemente del tipo de muestra. Es bien conocido que los especímenes pertenecientes al complejo *C. neoformans* pueden existir tanto en fase levaduriforme como filamentosa y que la micosis que producen suele estar precedida por la inhalación de partículas infecciosas. A pesar de esto, no suelen considerarse entre los hongos patógenos humanos dimórficos debido a que el hallazgo de hifas en los tejidos es muy infrecuente y las mismas no se consideran esenciales para la virulencia; adicionalmente, aún no queda claro por qué están constituidas dichas partículas infecciosas: levaduras desecadas o basidiosporas producto de la reproducción sexual, ya sean entre hifas de *MAT* opuesto o del mismo tipo. No obstante, el análisis del tipo de apareamiento en estos microorganismos, resulta relevante ya que se ha demostrado que las células *MAT α* , además de encontrarse en mayor proporción tanto en muestras clínicas como ambientales, se asocian a mayor virulencia y tendencia a la diseminación al SNC. Los análisis moleculares indican que los genes involucrados en la reproducción sexual del complejo *C. neoformans* se encuentran estrechamente relacionados con aquellos que codifican para los marcadores de virulencia (polisacárido capsular, síntesis de melanina, termotolerancia, etc) y que esta relación es más estrecha en las levaduras con este tipo de apareamiento (Litvintseva y Mitchell, 2009; Metin *et al.*, 2010; del Poeta y Casadevall, 2011). De estos análisis se desprende la importancia práctica de estos conocimientos.

Los resultados encontrados hasta aquí presentan correspondencia con la literatura internacional más actualizada y sentaron las bases para los estudios posteriores de caracterización mediante técnicas moleculares de mayor resolución.

Entre las tecnologías estandarizadas más empleadas en este sentido se encuentra el AFLP, el cual se implementó según la metodología previamente descrita (Boekhout *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2009) para la caracterización inicial de los aislamientos y como referencia en la evaluación de un juego de marcadores microsátélites seleccionados a partir de la

secuencia nucleotídica de la cepa tipo H99. De los análisis realizados se puede inferir la existencia de fuentes alternativas de infección diferentes de las excretas de palomas y que el empleo de los marcadores seleccionados para la tipificación por STR presenta un alto poder discriminatorio. Esta última, como técnica de caracterización genética, mostró a su vez varias ventajas adicionales al brindar una genotipificación relativamente económica, en corto tiempo, cuyos resultados, al ser expresados numéricamente son más fáciles de interpretar y comparar, al tiempo que por ser más compactos, facilitan su almacenamiento en dispositivos electrónicos intercambiables (de Valk *et al.*, 2009; Klaassen, 2009). Actualmente se disponen de tecnologías altamente resolutivas como el MLST, propuesta como uno de los métodos de referencia en la caracterización genotípica de las levaduras del complejo *C. neoformans*. No obstante, la complejidad de su ejecución, la cual requiere la secuenciación de al menos siete *loci*, la hacen poco factible (Meyer *et al.*, 2009).

La interrogante sobre la presencia o no de diversidad genética entre los aislamientos cubanos del complejo *C. neoformans*, la cual dio lugar al planteamiento de la hipótesis de este trabajo, quedó demostrada para el grupo de aislamientos clínicos (distribuidos en mayor o menor proporción entre 19 de los 20 genogrupos obtenidos mediante la tipificación con STR). Sin embargo, este aspecto de la hipótesis queda refutado en relación a los especímenes obtenidos a partir de excretas de palomas debido a su escasa variabilidad genética (el 80 % de los mismos se congregó en dos de los 20 genogrupos). Hasta el momento no existen muchos estudios publicados relacionados con este tema y en general los consultados demuestran una relación estrecha entre los genotipos clínicos y ambientales (Boekhout *et al.*, 2001; Trilles *et al.*, 2003). No obstante, trabajos publicados recientemente, incluso con posterioridad a la obtención de estos resultados, constituyen una evidencia más sobre la veracidad de los mismos (Zhu *et al.*, 2010).

Para dar continuidad a los estudios sobre posibles fuentes de infección de criptocosis humana en Cuba y sabiendo del reporte de su agente causal asociado a las plantas y sus detritos, se inició su búsqueda a partir de estos nichos ecológicos. Con este objetivo se estudiaron 662 hisopados de cavidades o ranuras profundas obtenidas de 331 ejemplares adultos de plantas que se encontraban en áreas públicas de zonas urbanas. A pesar de que los reportes revisados sugieren que la presencia del complejo *C. neoformans* no se

encuentra restringido a determinadas plantas, la inclusión de algunas especies (almendros, *Ficus* spp. y especies de cactáceas) obedeció fundamentalmente a reportes previos de la presencia estas levaduras en las mismas (Randhawa *et al.*, 2006; Hiremath *et al.*, 2008; Randhawa *et al.*, 2008). Los métodos convencionales empleados permitieron la selección de 196 aislamientos con características compatibles con las de dicho complejo, especialmente con la especie *C. neoformans* (62,75 %). No obstante, los patrones genotípicos obtenidos mediante AFLP y la posterior secuenciación de las regiones ITS1/5.8S/ITS2 y D1-D2 permitió demostrar que solo uno correspondió con *C. neoformans* var. *grubii*. En este estudio los resultados de los esfuerzos por lograr el aislamiento de estas levaduras demostró su baja prevalencia a partir de las fuentes muestreadas, lo que permite sugerir en este caso que i) los métodos convencionales no son suficientemente confiables y que estos necesitan el respaldo de herramientas moleculares, especialmente cuando se trata de la identificación del complejo *C. neoformans* a partir de fuentes naturales, ii) la especie de levadura más representada en las muestras estudiadas es *C. heveanensis*, iii) la especie de árbol más asociada a este género en Cuba es el almendro y iv) que se deben continuar los estudios en otras zonas geográficas del país e incluir mayor diversidad y número de especies de árboles ya que en la medida que se logren determinar los posibles nichos ecológicos de estas levaduras, se podrán desarrollar medidas de protección que permitan evitar la infección humana por las mismas (Restrepo *et al.*, 2000).

Mediante el empleo de la tipificación con STR, se caracterizaron aquellos aislamientos seriados obtenidos de pacientes con criptococosis recurrente. Con el objetivo de obtener una visión integral de este proceso, se determinó la susceptibilidad *in vitro* frente a los antifúngicos empleados en la primera línea de tratamiento de esta micosis. Al igual que en el estudio anterior, los resultados fueron significativos y novedosos al revelar que más del 70 % de los pacientes se encontraban infectados por genotipos diferentes y que si bien existe una tendencia hacia el incremento de las CIM de los agentes empleados en el tratamiento, ninguno de los especímenes mostró resistencia. Estos hallazgos permiten de una parte, confirmar la amplia variabilidad genética existente entre los aislamientos clínicos cubanos y de otra, plantear una nueva hipótesis sobre el posible mecanismo de recurrencia de esta micosis basado en la infección con múltiples genotipos. Según sugieren los

resultados de este estudio, esta posibilidad pudiera estar dada por la adquisición de varios genotipos al mismo tiempo, ya sea desde el inicio de la infección o en el transcurso de la misma. Estudios previos demuestran la obicuidad de las especies del complejo *C. neoformans* las cuales pueden coexistir en un mismo nicho ecológico lo que favorece la infección simultánea por diferentes tipos (Lazera *et al.*, 2000; Mandal *et al.*, 2005; Kidd *et al.*, 2007). Otra vía que pudiera explicar este mecanismo es el proceso de microevolución microbiana; en este sentido, actualmente se conoce que los microorganismos capaces de sobrevivir en diferentes ambientes deben modular constantemente sus mecanismos de adaptación y que en las poblaciones clonales, dicha adaptación puede generar diversidad. Los hospedadores constituyen importantes microambientes para los hongos patógenos como las levaduras del complejo *C. neoformans* y en este contexto se pudieran generar cambios que le permitirían evadir la respuesta inflamatoria. A su vez, estos agentes son capaces de generar una respuesta inmune alterada, lo cual se ha asociado a afectación de la respuesta a la terapia antifúngica. Todos estos aspectos en su conjunto pueden promover la selección de determinadas variantes lo que favorece la infección crónica o recurrente (Jain y Fries, 2008).

Por la importancia actual que encierra el fenómeno de la resistencia a los antimicrobianos, se incluyó en los estudios de caracterización los perfiles de susceptibilidad a siete agentes antifúngicos. A pesar de la carencia de puntos de corte establecidos para el complejo *C. neoformans*, los resultados mediante el método de microdilución en medio líquido, método de referencia actual, permiten concluir que los aislamientos de procedencia clínica, especialmente de pacientes con sida, presentan valores de CIM menores en comparación con los restantes incluidos en el estudio y que dado todas las ventajas farmacocinéticas, sumado a la elevada susceptibilidad mostrada frente al isavuconazol, este pudiera convertirse en una opción terapéutica excelente para el tratamiento de la criptococosis.

Estos resultados permiten refutar la hipótesis planteada en este trabajo en cuanto a la resistencia a los antifúngicos para el grupo de aislamientos obtenidos a partir de muestras clínicas. No obstante, el hallazgo de dos especímenes de procedencia ambiental resistentes al fluconazol y la evidencia de valores de CIM más elevados de manera general en comparación con los de origen clínico, hacen aceptar el planteamiento para el grupo de

aislamientos ambientales. Se debe reconocer sin embargo, que estas afirmaciones pudieran estar sesgadas por la carencia de puntos de cortes específicos para el complejo *C. neoformans*.

Durante las últimas décadas se ha demostrado una mayor incidencia de las infecciones fúngicas, lo que ha favorecido el uso cada vez más frecuente de antimicóticos sistémicos, especialmente el fluconazol (Cuenca-Estrella, 2010). Paralelamente, se ha incrementado el empleo de azoles de uso agrícola para el control de plagas (Serfling *et al.*, 2007). Esto ha estimulado el desarrollo de aislamientos con susceptibilidad disminuida o resistentes a este azol (Vandenbossche *et al.*, 2002) y que se haga cada vez más evidente el fenómeno de resistencia cruzada entre los miembros de esta familia de antifúngicos (Kanafi y Perfect, 2008). Actualmente se han puesto al descubierto al menos cuatro mecanismos moleculares que traen como consecuencia la resistencia adquirida frente a los azoles: i) la disminución de la concentración intracelular del antifúngico mediante bombas de expulsión activa que actúan de forma selectiva frente al fluconazol (codificadas por *MDR*) o de forma indistinta para cualquiera de los azoles (codificada por *CDR*); ii) la alteración estructural de la diana sobre la que actúan estas drogas así como iii) la sobre expresión de la misma (ambas codificadas por *ERG11*) y iv) el desarrollo de vías alternas de producción de esteroides (codificada por *ERG3*) (Cuenca-Estrella, 2010). Adicionalmente, también se conoce que algunos aislamientos pueden portar heterorresistencia, especialmente frente al fluconazol; mecanismo mediante el cual determinadas subpoblaciones de células dentro de una misma colonia se diferencian por una mayor tolerancia a concentraciones más altas del antifúngico. Este fenómeno no depende de la exposición previa a los antifúngicos y ha sido descrito en ambas especies del complejo *C. neoformans* (Sionov *et al.*, 2009; Varma y Kwon-Chung, 2010).

Estos antecedentes, sumados a la complejidad intrínseca del método recomendado por el CLSI para la determinación de la susceptibilidad *in vitro*, han motivado el desarrollo de otros alternativos como los de difusión en agar. Los resultados de la evaluación de las tiras de Etest y los disco con vistas a determinar la CIM del fluconazol, mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con los obtenidos por microdilución en medio líquido. Sin embargo, dada las ventajas de los primeros en cuanto a su fácil y rápida ejecución y que las discordancias entre los mismos no clasificaron como muy importantes, hacen a estos

métodos cada vez más atractivos con vistas a la vigilancia de la resistencia en los laboratorios de asistencia médica. La determinación de valores de corte para *C. neoformans* específicos según el método empleado, pudiera incrementar aún más el valor de estas pruebas. No obstante, ante la carencia de los mismos, la re-evaluación de los aislamientos con CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ en laboratorios de referencia mediante microdilución en medio líquido parece ser una opción conveniente.

Desde que se diagnosticaron los primeros casos de criptococosis asociados al sida en Cuba, en el LMIPK se iniciaron los estudios en torno a esta micosis. De forma general, los resultados expuestos y discutidos en este trabajo han permitido enriquecer y consolidar los conocimientos ya existentes sobre esta micosis y su agente causal, mejorar el servicio tanto de diagnóstico como de referencia dando respuesta a la problemática de salud en el país y brindar soporte para el enfrentamiento de otras situaciones relacionadas con esta u otras enfermedades micóticas, aspectos que repercuten directamente en el sistema de salud cubano. Así mismo, estos resultados pudieran tener implicaciones más allá de las fronteras de Cuba, por lo que sientan pautas para futuros estudios comparativos de perfiles genéticos y de susceptibilidad antimicrobiana.

El avance cada vez más rápido de la tecnología y su aplicación a la ciencia hace vislumbrar hallazgos impensados en torno a este gigante que ha despertado.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- Se demostró por primera vez en Cuba el predominio de *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A con tipo de apareamiento α tanto en muestras clínicas como ambientales.
- Los aislamientos clínicos y ambientales estudiados mostraron diferencias evidentes en cuanto su variabilidad genética, lo que sugiere la presencia de nichos ecológicos de infección humana adicionales a los analizados en este trabajo.
- El panel de marcadores seleccionados mostró un alto poder discriminatorio y la tipificación con el STR, como técnica de caracterización genética reveló su superioridad con relación al AFLP para los estudios de epidemiología molecular de *C. neoformans* var. *grubii*.
- El estudio de aislamientos clínicos consecutivos de *C. neoformans* var. *grubii* apunta hacia la co-infección con diferentes genotipos como uno de los mecanismos patogénicos de la criptococosis recurrente.
- La determinación de la CIM de los antifúngicos de primera línea demostró que la resistencia no constituye un problema entre los aislamientos clínicos cubanos de *C. neoformans* var. *grubii* estudiados y que los azoles de más reciente generación, especialmente isavuconazol, pudieran ser una alternativa terapéutica eficaz en el tratamiento de la criptococosis.

VI. RECOMENDACIONES

VI. RECOMENDACIONES

- Mantener la vigilancia sobre el surgimiento de cepas resistentes frente a los antifúngicos de primera línea en el tratamiento anti-criptococósico. En este sentido la evaluación de los métodos de difusión en agar avalan su empleo en los laboratorios de asistencia médica para la pesquisa de la resistencia al fluconazol en *C. neoformans* var. *grubii*.
- Llevar a cabo estudios de patogenicidad que permitan corroborar los resultados obtenidos de la tipificación molecular mediante el STR.
- Ampliar los estudios ambientales con vistas a determinar la presencia de otros nichos ecológicos como posibles fuentes de infección por *C. neoformans* en Cuba.
- Realizar los estudios fisiológicos necesarios para la completa identificación de las nuevas especies aisladas a partir de material vegetal y estudiar su potencial patogénico.

**VII. REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

- Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of *Psittaciformes* in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia* 2006; 161: 83-91.
- Aller AI, Martin-Mazuelos E, Gutierrez MJ. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 997-1000.
- Álvarez LP, Martínez G, Fernández C, Llop A. Diagnóstico de criptococosis. Comparación de dos sistemas de látex para la detección de antígeno. *Rev Cubana Med Trop* 1992; 44: 29-33.
- Álvarez M, Casadevall A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* 2006; 16: 2161-5.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389-402.
- Arian S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; 45: 569-87.
- 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.

- Barchiesi F, Schimizzi AM, Najvar LK, Bocanegra R, Caselli F, Di Cesare S, Giannini D, Di Francesco LF, Giacometti A, Carle F, Scalise G, Graybill JR. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1355-9.
- Barreto de Oliveira MT, Boekhout T, Theelen B, Hagen F, Baroni FA, Lazera MS, Lengeler KB, Heitman J, Rivera IN, Paula CR: *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. J Clin Microbiol 2004, 42:1356-9.
- Benson G. Tandem repeats finder: A program to analyze DNA Sequences. Nucl Acids Res 1999; 27: 573-80.
- Bii CC, Makimura K, Abe S, Taguchi H, Mugasia OM, Revathi G, Wamae NC, Kamiya S. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. Mycoses 2007; 50: 25-30.
- Birley HD, Johnson EM, McDonald P, Parry C, Carey PB, Warnock DW. Azole drug resistance as a cause of clinical relapse in AIDS patients with cryptococcal meningitis. Int J STD AIDS 1995; 6: 353-5.
- Blasi E, Brozzetti A, Francisci D, Neglia R, Cardinali G, Bistoni F, Vidotto V, Baldelli F. Evidence of microevolution in a clinical case of recurrent *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 535-43.
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 2001; 147: 891-907.
- Bovers M, Diaz MR, Hagen F, Spanjaard L, Duim B, Visser CE, Hoogveld HL, Scharringa J, Hoepelman IM, Fell JW, Boekhout T. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. J Clin Microbiol 2007; 45: 1874-83.
- Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. Rev Iberoam Micol 2008(a); 25: S4-12.

- Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol* 2008(b); 45: 400-21.
- Brito M. Prevalencia de *Cryptococcus neoformans* en los palomares registrados en Ciudad de La Habana. Trabajo para optar por el Título de Especialista de Primer Grado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” Ciudad de La Habana; 2000.
- Byrnes EJ III, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P, Carter DA, Chaturvedi V, Bildfell RJ, May RC, Heitman J. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog.* 2010; doi: e1000850.
- 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.
- Cabral LF. Wood, animals and human beings as reservoirs for *human Cryptococcus neoformans* infection. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 40-2.
- Carrillo-Munoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Quindós G, Marcos-Arias C, Eraso E, Cardenes D, Ortiz-Maestro O, Santos P, Estivill D, Guardia C, Giusiano G. Antifungal activity of posaconazole against *Candida* spp. and non-*Candida* clinical yeasts isolates. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23: 122-5.
- Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington DC 1998.
- Casadevall A, Spitzer ED, Webb D, Rinaldi MG. Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1383-6.
- Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi-the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 332-7.
- Casadevall A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? *J Clin Invest* 2010; 120: 1389-92.

- Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. J Trop Med Hyg 1967; 70: 181-4.
- Chang HH, Lee NY, Ko WC, Lee HC, Yang YH, Wu CJ, Chang CM. Voriconazole inhibition of tacrolimus metabolism in a kidney transplant recipient with fluconazole-resistant cryptococcal meningitis. Int J Infect Dis 2010; 14: 348-50.
- Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, Paul-Satyaseela M, Kim KS, Kwon-Chung KJ. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. Infect Immun 2004; 72: 4985-95.
- Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2010; 77: 120-7.
- 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.
- Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents: new drugs, old drugs. Med J Aust 2007; 187:404-9.
- Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D. *In vitro* susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. J Clin Microbiol 2010; 48: 4115-20.
- Chow SK, Casadevall A. Evaluation of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan-protein conjugates as vaccine candidate against murine cryptococcosis. Vaccine 2011; 29: 1891-98.
- Chowdhary A, Randhawa HS, Prakash A, Meis JF. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in India: an update. Crit Rev Microbiol 2011; 13: 1875-88.
- 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 (a).

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 3th Informational Supplement document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008 (b).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved standard M44-A. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2008 (c).
- Costa JJ, Cordeiro AK, Freire RA, Cordeiro RA, Nogueira RS, Araújo FE, Collares DS, de Araújo MP, Gadelha MF. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: A review. *Can J Microbiol* 2010; 56: 445-58.
- 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.
- Curbelo A. Septicemia y meningitis a *Cryptococcus neoformans*. *Arch Hosp Univ (Cuba)* 1951; 9: 324-30.
- Dannaoui E, Paugam A, Develoux M, Chochillon C, Matheron J, Datry A, Bouges-Michel C, Bonnal C, Dromer F, Bretagne S. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 863-9.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Baarn/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2009.
- de Valk HA, Meis JF, Bretagne S, Costa JM, Lasker BA, Balajee SA, Pasqualotto AC, Anderson MJ, Alcázar-Fuoli L, Mellado E, Klaassen CH. Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: Proof of concept. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 180-7.
- de Valk HA, Meis JF, Klaassen CH. Microsatellite based typing of *Aspergillus fumigatus*: Strengths, pitfalls and solutions. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 268-72.

- DeBess E, Cieslak PR, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R, Free C, Dykstra E, Nett RJ, Chiller T, Lockhart SR, Harris J. Emergence of *Cryptococcus gattii* - Pacific Northwest, 2004 – 2010. MMWR 2010; 59: 865-8.
- del Poeta M, Casadevall A. Ten challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. Mycopathologia 2011; doi 10.1007/s11046-011-9473-z.
- Delgado AC, Taguchi H, Mikami Y, Myiajy Y, Villares MC, Moretti ML. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. Mycopathologia 2005; 159: 7-11.
- Desnos-Ollivier M, Patel S, Spaulding AR, Charlier C, García-Hermoso D, Nielsen K, Dromer F. Mixed infections and *in vivo* evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. mBio 2010; doi:10.1128/mBio.00091-10.
- Disease Listing: *Cryptococcus* general information. Available: [Http://Www.Cdc.Gov/Nczved/Dfbmd/Disease_Listing/Cryptococcus_Gi.Html](http://www.Cdc.Gov/Nczved/Dfbmd/Disease_Listing/Cryptococcus_Gi.Html). Accessed 2009 Nov 19.
- Dorsthorst DTA, Verweij PE, Meletiadis J, Bergervoet M, Punt NC, Meis JF, Mouton JW. *In vitro* interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2982-9.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol 1990; 28: 1642-4.
- Ellis DH. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. J Clin Microbiol 1987; 25: 430-1.
- Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). Am J Hyg 1955; 62: 227-52.
- Enache-Angoulvant A, Chandénier J, Symoens F, Lacube P, Bolognini J, Douchet C, Piorot JL, Hennequin C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. J Clin Microbiol 2007; 45: 1261-5.

- Escandon P, Huérfano S, Castaneda E. Experimental inoculation of *Terminalia catappa* seedlings with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C. *Biomedica* 2002; 22: 524-8.
- Escandón P, Sanchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type A in Colombia. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 625-35.
- Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodríguez-Tudela JL, Verweij PE. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3884-9.
- Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A. Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 858-64.
- Espinel-Ingroff A. Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing Zygomycetes, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin B. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3616-22.
- Espinel-Ingroff A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 121-36.
- Favel A, Chastin C, Thomet AL, Regli P, Michel-Nguyen A, Penaud A. Evaluation of the Etest for antifungal susceptibility testing of *Candida glabrata*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 146-8.

- Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect Immun* 2000; 68: 4225-37.
- 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.
- Fera MT, La Camera E, De Sarro A. New triazoles and echinocandins: Mode of action, *in vitro* activity and mechanisms of resistance *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 981-98.
- Fernández CM, González M, Illnait MT, Martínez GF. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *Rev Cubana Med Trop* 1998(b); 50: 48-53.
- Fernández CM, Martínez GF, Álvarez LP, Rodríguez R, Álvarez C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated in Havana City. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 120.
- Fernández CM, Martínez GF, Illnait MT, Perurena MR, González M. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en aislamientos clínicos cubanos. *Rev Cub Med Trop*. 1998(a); 50: 167-9.
- Fernández CM, Pimentel T, Martínez GF, González M. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a *Cryptococcus neoformans*. *Rev Cubana Med Trop* 1999; 51: 55-7.
- Fernández M. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de fuentes naturales en la ciudad de Pinar del Río. Trabajo para optar por el Título de Especialista de Primer Grado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, Ciudad de la Habana, 2001.
- Fonseca A, Boekhout T, Fell JW. *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (Eds.) *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science & Technology, Amsterdam, 2011; p: 1665-741.

- Fraser A, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, Hietman J. Same-sex mating and the origin of Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 2005; doi: 10.1038.
- Frases S, Salazar A, Dodachova E, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. *Ap Environ Microbiol* 2007; 73: 615-21.
- Friedman GD, Fessel WJ, Udaltsova NV, Hurley LB. Cryptococcosis: the 1981–2000 epidemic. *Mycoses* 2005; 48: 122-5.
- Friese G, Discher T, Füssle R, Schmalreck A, Lohmeyer J. Development of azole resistance during fluconazole maintenance therapy for AIDS associated cryptococcal disease. *AIDS* 2001, 15: 2344-5.
- Fusco-Almeida AM, Teruyuki-Matsumoto M, Baeza LC, Bellan de Oliveira R, Pizzirani-Kleiner AA, de Souza Carvalho-Melhem M, Mendes-Giannini MJS. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Res* 2007; 7: 152-64.
- Galanis E, Hoang L, Kibsey P, Morshed M, Phillips P. Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases: Lessons learned from British Columbia. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2009; 20: 23-28.
- Galanis E, Macdougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 251-7.
- García-Hermoso D, Janbon G, Dromer F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3204-9.
- Gato R, Martínez GF, Rodríguez H, Otero A, Sarracent J, Illnait MT. Reconocimiento de células intactas de *Cryptococcus neoformans* por el AcM 4B3 antiglucuronoxilomanano. *Rev Cub Med Trop* 2006; 58 (2): 162-4.
- Golubev W, Sampaio JP. New filobasidiaceous yeast found in the phylloplane of fern. *J Gen Appl Microbiol* 2009; 55: 441-6.

- Greer ND. Posaconazole (Noxafil): A new triazole antifungal agent. Proc (Bayl Univ Med Cent) 2007; 20: 188-96.
- Guerrero A, Jain N, Wang X, Fries BC. *Cryptococcus neoformans* variants generated by phenotypic switching differ in virulence through effects on macrophage activation. Infect Immun 2010; 78: 1049-57.
- Guinea J, Bouza E. Isavuconazole: a new and promising antifungal triazole for the treatment of invasive fungal infections. Future Microbiol 2008; 3: 603-15.
- Guinea J, Hagen F, Pelaez T, Boekhout T, Tahoune H, Torres-Narbona M, Bouza E. Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain Med Mycol 2010; 48: 942-8.
- Gündeş SG, Gulenc S, Bingol R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C Aux systems in the identification of clinically significant yeasts. J Med Microbiol 2001; 50: 1105-10.
- Hagen F, Boekhout T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. Mycopathologia 2010; 70: 209-11.
- Hagen F, Illnait MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH, Boekhout T, Meis JF. *In vitro* antifungal susceptibilities and AFLP genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2010(a); 54, doi:10.1128.
- 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(b); 48: 528-31.
- 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.

- Hanafy A, Kaocharoen S, Jover-Botella A, Katsu M, Iida S, Kogure T, Gonoi T, Mikami Y, Meyer W. Multilocus microsatellite typing for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *Med Mycol* 2008; 46: 685-96.
- Harrison TS. The burden of HIV-associated cryptococcal disease. *AIDS* 2009; 23: 531-2.
- Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance 2003; p. 1693-1711. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed., vol. 2. ASM Press, Washington, DC.
- Herbrecht R, Nivoix Y, Fohrer C, Natarajan-Ame S, Letscher-Bru V. Management of systemic fungal infections: alternatives to itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 39-8.
- 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.
- Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, Chen YC, Liao MH, Lin YH, Li SY. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2003; 52: 1071-6.
- Hu G, Liu I, Sham A, Stajich JE, Dietrich FS, Kronstad JW. Comparative hybridization reveals extensive genome variation in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Biol* 2008; 9(2): R41. doi:10.1186/gb.
- Huérfano S, Castañeda A, Castañeda E. Experimental infection of almond trees seedlings (*Terminalia catappa*) with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 131-2.
- Huston SM, Mody CH. Cryptococcosis: An emerging respiratory mycosis. *Clin Chest Med* 2009; 30: 253-64.
- Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 753-64.

- Ikeda R, Nishimura S, Nishikawa A, Shinida T. Production of agglutinating monoclonal antibody against antigen 8 specific for *Cryptococcus neoformans* serotype D. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3: 89-92.
- Illnait MT, Valdés IC, Fernández CM, Mendoza D, Perurena MR, Martínez GF. Criptococosis: una alerta necesaria. Rev Cubana Med Trop 2001(a); 53: 224-5.
- Illnait MT, Valdés IC, Fernández CM, Perurena MR, Martínez GF. Determinación de la LD₅₀ en cepas de *Cryptococcus neoformans* utilizando diferentes vías de inoculación. Rev Panam Infectol 2004; 6: 8-11.
- Illnait-Zaragozí MT, Gato R, Martínez FG, Otero A, Sarracent J, Rodríguez H, Fernández CM, Valdés IC. Efecto del anticuerpo monoclonal 4B3 en la infección experimental por *Cryptococcus neoformans*. Revista Rev Cubana Med Trop 2011(a); 63: 123-9.
- Illnait MT, Vilaseca JC, Fernández CM, Martínez GF. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of *Cryptococcus neoformans* antigen. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001(b); 96: 241-245.
- Illnait-Zaragozí MT, Hagen F, Fernández CM, Martínez GF, Polo JL, Boekhout T, Klaassen CH, Meis JF. Reactivation of a *Cryptococcus gattii* infection in a cheetah (*Acinonyx jubatus*) held in the National Zoo, Havana, Cuba. Mycoses. 2011(b); doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02046.
- Iqbal N, DeBess EE, Wohrle R, Sun B, Nett RJ, Ahlquis AM, Chiller T, Lockhart SR. Correlation of genotype and *in vitro* susceptibility of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of United States. J Clin Microbiol 2010; 48: 539-44.
- Jain N, Fries BC. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Mycopathologia 2008; 166: 181-8.
- Jain N, Wickes BL, Keller SM, Fu J, Casadevall A, Jain P, Ragan MA, Banerjee U, Fries BC. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. J Clin Microbiol 2005, 43:5733-42.
- Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. AIDS 2007; 21: 2119-29.

- 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.
- Johnston SA, May RC. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. PLoS Pathog 2010; 6, e1001041.
- Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin Infect Dis 2008; 46: 120-8.
- 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.
- Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* cryptococcal infections: A systematic review. Infection 2007; 35: 51-8.
- Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, Kronstad JW, Bartlett KH. 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.
- Klaassen CH MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. Med Mycol 2009; 47: S27-S33.
- Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. J Clin Microbiol 2009; 47: 3669-72.
- Kobayashi M, Murata K, Hiroshi HO, Tokura Y. Cryptococcosis: long-lasting presence of fungi after successful treatment. Acta Derm Venereol 2004; 84: 320-1.
- Kozubowski L, Heitman J. Profiting a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Microbiol Rev 2011; doi:10.1111/j.1574-6976.2011.

- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 193-203.
- 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; doi:10.1111/j.1439-0507.
- 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. (ed) ASM Press, Washington, DC. 2011; p: 3-15.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15: 535-7.
- Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 574-87.
- Kwon-Chung KJ. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 1975; 67: 1197-200.
- Larsen Ra, Bauer M, Thomas Am, Sanchez A, Citron D, Rathbun M, Harrison TS. Correspondence of *in vitro* and *in vivo* fluconazole dose-response curves for *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3297-307.
- Lazera MS, Salmito MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 2000; 38: 379-83.
- Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC, Vainstein MH. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Med Mycol* 2008; 46: 377-83.
- Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 693-9.
- Lester SJ, Malik R, Bartlett KH, Duncan CG. Cryptococcosis: Update and emergence of *Cryptococcus gattii*. *Vet Clin Pathol* 2011; 40: 40-1.

- Levitz SM, Boekhout T. *Cryptococcus*: The once-sleeping giant is fully awake. FEMS Yeast 2006; 6: 461-2.
- Li Y, Theuretzbacher U, Clancy CJ, Nguyen MH, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of posaconazole. Clin Pharmacokinet 2010; 49: 379-96.
- 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.
- Lin X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. Infect Genet Evol 2009; 9: 401-16.
- 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.
- 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.
- Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. Genetics 2006; 172: 2223-38.
- Loperana Y, Ren P, Li X, Bopp DJ, Ruiz A, Chaturverdi V, Rios-Velazquez C. Genotypic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. Mycopathologia 2010; 170: 279-85.
- Lozano M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. J Clin Microbiol 1998; 36: 2817-22.
- Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. Direct cell-to-cell spread of pathogenic yeast. BMC Immunol 2007; 8: 15.
- Macdougall L, Fyfe M, Romney M, Starr M, Galanis E. Risk Factors for *Cryptococcus gattii* Infection, British Columbia, Canada. Emerg Infect Dis 2011; 17: 193-9.

- Mandal P, Banerjee U, Casadevall A, Nosanchuk JD. Dual infections with pigmented and albino strains of *Cryptococcus neoformans* in patients with or without human immunodeficiency virus infection in India. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4766-72.
- Marr KA, Datta K, Pirofski LA, Barnes R. *Cryptococcus gattii* infection in healthy hosts: a sentinel for subclinical immunodeficiency? *Clin Infect Dis* 2011; doi: 10.1093/cid/cir756.
- Martínez GF, Álavez LP, Fernández CM, Llop A. Detección de anticuerpos anti *Cryptococcus neoformans* en tres grupos de sueros humanos. *Rev Cubana Med Trop* 1992; 44: 141-4.
- Martínez GF, Barrial L, Illnait MT, Valdés IC, Fernández CM, Perurena MR, Polo JL, Mendoza D. Utilidad de la D-prolina en la diferenciación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*. *Rev Cub Med Trop* 2004; 56: 77-9.
- Martínez LR, Ibom DC, Casadevall A, Fries BC. Characterization of phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Mycopathologia*. 2008; 166: 175-80.
- Martínez LR, Ntiamoah P, Gacser A, Casadevall A, Nosanchuk JD. Voriconazole inhibits melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51: 4396-400.
- Massonet C, van Eldere J, Vanechoutte M, de Baere T, Verhaegen J, Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2209-11.
- Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, De Souza-Carvalho M, Soares Mendes-Giannini MJ. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 49: 41-7.
- Meis JF, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D and The Global Antifungal Surveillance Group. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 36: 215-23.

- Messer SA, Moet GJ, Kirby J, Jones RN. Activity of contemporary antifungal agents, including the novel echinocandin anidulafungin, tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1942-6.
- 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; 6: e1000961. doi:10.1371/journal.pgen.1000961.
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Fisher M, Gilgado F, Hagen F, Kaocharoen S, Litvintseva AP, Mitchell TG, Simwami SP, Trilles L, Viviani MA, Kwon-Chung J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 2009; 47: 561-70.
- Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 189-195.
- 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.
- Mondon P, Petter R, Amalfitano G, Luzzati R, Concia E, Polacheck I, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 856-61.
- Moraes EM, Primola NS, Hamdan JS. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. *Mycoses* 2002; 46: 164-8.
- Morschhäuser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 2010; 47: 94-106.
- Mueller UG, Wolfenbarger LL. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 1999; 14: 389-94.
- Müller FM, Staudigel A, Salvenmoser S, Tredup A, Miltenberger R, Herrmann HV. Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx

- of human immunodeficiency virus patients and from environmental Bavarian vine grapes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3014-16.
- Nandhakumar B, Kumar CP, Prabu D, Menon T. Mustard seed agar, a new medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 674.
 - Ngamskulrungrroj P, Gilgado F, Faganello J, Litvintseva AP, Leal AL, Tsui KM, Mitchell TG, Vainstein MH, Meyer W. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *Plos One* 2009; 4: e5862.
 - Nguyen MH, Yu Y. *In vitro* comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 471-2.
 - Odds FC. Drug evaluation: BAL-8557, a novel broad-spectrum triazole antifungal. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 766-72.
 - Olszewski MA, Hang Y, Huffnagle GB. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiol* 2010; 5: 1269-88.
 - Paliwal DK, Randhawa HS. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 346-8.
 - 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.
 - Pasqualotto AC, Denning DW. New and emerging treatments for fungal infections *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 19-30.
 - Pedroso RS, da Costa KR, Ferreira JC, Candido RC. Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 566-8.
 - Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 239-43.

- Pérez C, Dolande M, Moya M, Rosello A, de Capriles CR, Landaeta ME, Mata-Essayag S. *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*: Serotypes in Venezuela. *Mycopathologia* 2008; 166: 149-53.
- Perkins A, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 1144-7.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell T. 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.
- Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, Greenberg RN, Dupont B, Torres-Cisneros J, Just-Nubling G, Schlamm HT, Lutsar I, Espinel-Ingroff A, Johnson E. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1122-31.
- Perfect JR. Cryptococcosis. In: Kauffman CA, Mandell GL (ed) *Atlas of fungal infections*, 2nd edn. Springer, Philadelphia 2006; p: 85-98.
- Pfaller M, Zhang J, Messer S, Tumberland M, Mbidde E, Jessup C, Ghannoum M. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from Ugandan AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 191-9.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1875-80.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Bijie H, Dzierzanowska D, Klimko NN, Letscher-Bru V, Lisalova M, Muehlethaler K, Rennison C, Zaidi M. 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.

- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S, Diekema DJ. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 201-5.
- Polacheck I, Lebens GA. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *J Gen Microbiol* 1989; 135: 65-71.
- 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.
- Pryce TM, Palladino S, Price DM, Gardam DJ, Campbell PB, Christiansen KJ, Murray RJ. 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.
- Quintero E, Castañeda E, Ruiz A. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* the department of Cudinamarca - Colombia. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 93-8.
- Rabelo Y. Estudio sobre *Cryptococcus neoformans* en palomares de la Ciudad de Cienfuegos. Trabajo para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Ciudad de la Habana, 2002.
- Raimondi A, Ticozzi R, Sala G, Bellotti MG. Genotype-based differentiation of the *Cryptococcus neoformans* serotypes by combined PCRRFLP analysis of the capsule-associated genes CAP10 and CAP59. *Med Mycol* 2007; 45: 491-501.
- Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L, Woestenborghs F, Baert L, Massart DL, Odds FC. Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 163-77.
- Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Prakash A, Khan ZU, Xu J. Seasonal variations in the prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus*

- gattii* in decayed wood inside trunk hollows of diverse tree species in north-western India: A retrospective study. *Med Mycol* 2010; doi: 10.3109.
- Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Preeti Sinha K, Khan ZU, Sun S, Xu J. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Med Mycol* 2008; 46: 823-33.
 - 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.
 - Randhawa HS, Kowshik T, Preetisinha K, Chowdary A, Khan ZU, Yan Z, Xu J, Kumar A. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Med Mycol* 2006; 44: 623-30.
 - Refojo N, Perrotta D, Brudny M, Arrantes R, Hevia AI. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Med Mycol* 2008; 20: 1-8.
 - Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagalip E, Cooper CR Jr, McGinnis MR, Lazera MS, Barbosa FH, Bosco SM, Fr Camargo ZP, Coelho KIR, Fortes ST, Franco M, Montenegro MR, Sano A, Wankes B. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med Mycol* 2000; 38: 67-77.
 - Richardson MD. Cryptococcosis. In: Richardson MD y Warnock DW (eds) *Fungal infection: Diagnosis and management*, 3th edition. Blackwell Publishing Ltd, 2003; p: 215-30.
 - Rodero L, Cordoba S, Cahn P, Hochenfellner F, Davel G, Canteros C, Kaufman S, Guelfand L. *In vitro* susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45; 239-42.
 - Rodríguez ML, Fonseca FL, Frases S, Casadevall A, Nimrichter L. The still obscure attributes of cryptococcal glucuronoxylomannan *Med Mycol* 2009; 3: 1-7.

- Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Lass-Flörl C. EUCAST breakpoints for antifungals. *Drug News Perspect* 2010; 23: 93-7.
- Rodríguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M. Statistical analysis of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Clin Microb* 2007; 45: 109-11.
- Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2009-15.
- Sarl B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou1 JL, Buisson Y. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 563-5.
- Saul N, Krockenberger M, Carter D. Evidence of recombination in mixed-mating-type and only populations of *Cryptococcus gattii* sourced from single *Eucalyptus* tree hollows. *Euk Cell* 2008; 7: 727-34.
- Saylo CA, Dadachova E, Casadevall A. Murine IgG1 and IgG3 isotype switch variants promote phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* through different receptors. *J Immunol* 2010; 184: 336-43.
- Schmitt-Hoffmann A, Roos B, Heep M, Schleimer M, Weidekamm E, Brown T, Roehrle M, Beglinger C. Single-ascending-dose pharmacokinetics and safety of the novel broad-spectrum antifungal triazole BAL4815 after intravenous infusions (50, 100, and 200 milligrams) and oral administrations (100, 200, and 400 milligrams) of its prodrug, BAL8557, in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2006(a); 50: 279-85.
- Schmitt-Hoffmann A, Roos B, Maares J, Heep M, Spickerman J, Weidekamm E, Brown T, Roehrle M. Triazole BAL4815 after intravenous infusion and oral administration of

- its prodrug, BAL8557, in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2006(b); 50: 286-93.
- Schwarz P, Janbon G, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. Combination of amphotericin B with flucytosine is active *in vitro* against flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 383-5.
 - Seifert H, Aurbach U, Stefanik D, Cornely O. *In vitro* activities of isavuconazole and other antifungal agents against *Candida* bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1818-21.
 - Serfling A, Wohlrab J, Deising HB. Treatment of a clinically relevant plant-pathogenic fungus with an agricultural azole causes cross-resistance to medical azoles and potentiates caspofungin efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3672-6.
 - Shi M, Li SS, Zheng C, Jones GJ, Kim KS, Zhou H, Kubes P, Mody CH. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest* 2010; 120: 1683-93.
 - Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature* 1949; 163: 688.
 - Souza LK, Fernandes OFL, Kobayashi CC, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Souza-Júnior AH, Silva MR. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia City, Goiás, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005; 47: 253-6.
 - Spitzer ED, Spitzer SG, Freundlich LF, Casadevall A. Persistence of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* meningitis. *Lancet* 1993; 341: 595-6.
 - Sullivan D, Haynes K, Moran G, Shanley D, Coleman D. Persistence, replacement, and microevolution of *Cryptococcus neoformans* strains in recurrent meningitis in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1739-44.
 - Tapia CV. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infect* 2009; 26: 144-50.

- Tay ST, Na SL, Tajuddin TH. Natural occurrence and growth reaction on canavanine-glycine-bromothymol blue agar of non-*neoformans* *Cryptococcus* spp. in Malaysia. *Mycoses* 2008; 51: 515-9.
- Tay ST, Tanty Haryanty T, Ng KP, Rohani MY, Hamimah H. *In vitro* susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. *Mycoses* 2006; 49: 324-30.
- Tendolkar UM. Tobacco agar-used and reused. *Med Mycol* 2005; 43: 739.
- Thompson GR III, Fothergill AW, Wiederhold NP, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF. Evaluation of Etest method for determining isavuconazole MICs against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 959-61.
- Thompson GR III, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 309-11.
- Thompson GR III, Wiederhold NP. Isavuconazole: a comprehensive review of spectrum of activity of a new triazole *Mycopathologia* 2010; 170: 291-313.
- Török E, Moran E, Cooke F. *Cryptococcus neoformans* In Oxford handbook of infectious diseases and microbiology. Oxford University Press, New York 2010 p. 527-9.
- Torres HA, Hachem RY, Chemaly RF, Kontoyiannis DP, Raad II. Posaconazole: A broad-spectrum triazole antifungal. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 775-85.
- 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. Trabajo para optar por el Título de Especialista de Primer Grado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” Ciudad de La Habana; 2002.
- Trilles L, Lazera M, Wanke B, Theelen B, Boekhout T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med Mycol* 2003; 41: 383-90.

- Türel O. Newer antifungal agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 325-38.
- Ullmann AJ, Cornely OA, Burchardt A, Hachem R, Kontoyiannis DP, Topelt K, Courtney R, Wexler D, Krishna G, Martinho M, Corcoran G, Raad I. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 658-66.
- Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 2003; 11: 479-87.
- Valdés IC, Martínez GM, Fernández CM, Illnait MT. Pigmentación de cepas de *Cryptococcus neoformans* sobre agar semilla de girasol. *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55: 119-20.
- Vandebossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 918-21.
- Varma A, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2303-11.
- Velagapudi RM, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2009; 77: 4345-55.
- 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.
- Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, Lemmer K, Tintelnot K, Colom-Valiente MF, Swinne D, Velegaki A, Velho R. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 614-9.
- Vuylsteke M, Peleman JD, van Eijk MJ. AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nature Protocols* 2007; 2: 1387-98.

- Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. *Clin Chest Med* 2009; 30: 391-408.
- Yamazaki T, Inagaki Y, Fujii T, Ohwada J, Tsukazaki M, Umeda I, Kobayashi K, Shimma N, Page MG, Arisawa M. *In vitro* activity of isavuconazole against 140 reference fungal strains and 165 clinically isolated yeasts from Japan *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 324-31.
- Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeasts, a taxonomic study*, 4th edition. Elsevier, Amsterdam 1998; p: 77-100.
- 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.
- Zaragoza O, Rodríguez ML, De Jesús M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 2009; 68: 133-216.
- Zhu J, Kang Y, Uno J, Taguchi H, Liu Y, Ohata M, Tanaka R, Moretti MK, Mikami Y. Comparison of genotypes between environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* based on microsatellite patterns. *Mycopathologia* 2010; 169: 47-55.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA
DEL AUTOR

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

RELACIONADAS CON EL TEMA DE LA TESIS

PUBLICACIONES

1. 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 (4): 1580-2.
2. Illnait-Zaragozı MT, Meis JF, Martínez-Machín GF, Curf-Breuker I, Fernández-Andreu CM, Perurena-Lancha MR. Susceptibilidad *in vitro* frente a fluconazol y voriconazol de cepas de *Cryptococcus* aisladas en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2009; 61 (1): 70-4.
3. Illnait-Zaragozı 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 Infectious Diseases* 2010, 10:289 doi: 10.1186/1471-2334-10-289.
4. 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 (2): e9124. doi:10.1371.
5. Illnait-Zaragozı MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Perurena-Lancha MR, Theelen B, Boekhout T, Meis JF, Klaassen CH. Environmental isolation and characterization of *Cryptococcus* species from living trees in Havana City, Cuba. *Mycoses* 2012 (en prensa)

RESÚMENES PUBLICADOS:

1. Martínez GF, Illnait MT, Fernández CM, Valdés IC, Perurena MR, Torres JM. Cryptococcosis and *Cryptococcus neoformans* in Cuba. *Mycoses* 2005 48(2): 59.
2. Illnait MT, Martínez GF, Fernández CM, Valdés IC, Perurena MR, Torres JM. Cryptococcosis in Cuba. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2006; 14 (suppl): 18-9.
3. Illnait MT, Martínez GF, Fernández CM, Perurena MR, Valdés EA, Jerez LE, Boekhout T, Klaassen CH, Meis JF. First report of *Cryptococcus gattii* environmental isolates in Cuba. *J Chemother* 2007; 19 (suppl 3): 55-6.
4. Illnait MT, Martínez GF, Fernández CM, Perurena MR, Klaassen CH, Meis JF. Characterization of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. *Mycoses* 2009; 52 (suppl1): 89-90.
5. Illnait MT, Martínez GF, Fernández CM, Perurena MR, Boekhout T, Meis JF, Klaassen CH. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus* isolates from Cuba. *Mycoses* 2009; 52 (suppl1): 55-6.
6. Illnait-Zaragozı MT, Martínez-Machın GF, Fernández Andreu CM, Perurena-Lancha MR, Rodríguez-Gutierrez I, Monroy-Vaca EX, Claassen KH, Boekhout T, Meis JF. Antifungal susceptibility and genetic characterization of Cuban *Cryptococcus* strains. *Mycoses* 2011; 54 (S2): 170.
7. Illnait-Zaragozı MT, Sprong T, Martínez-Machın GF, Valdés-Hernández IC, Fernández-Andreu CM, Perurena-Lancha MR, Monroy-Vaca EX, Netea M, Meis JF. Clinical and environmental *Cryptococcus neoformans*: Cytokine profiles in human PBMC and in vivo experimental pathogenicity. *Mycoses* 2011; 54 (S2): 152.

EVENTOS

2nd Trends in Medical Mycolgy (Berlın, 2005)

“Criptococosis and *Cryptococcus neoformans* in Cuba”. Co-autora

Congreso de Microbiología Médica (Arnhem, 2006).

“Cryptococcosis in Cuba”. Autora

46th Annual Intercience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy (EE.UU, 2006).

“*In vitro* activity of the new azole BAL 4815 compared with six other antifungal agents against 155 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba”. Autora

“Molecular characterization of 178 *Cryptococcus neoformans* var *grubii* isolates from Cuba by AFLP and microsatellite markers”. Autora

Fórum Nacional de Ciencia y Técnica. XXV Edición (La Habana, 2007).

“Criptococosis en Cuba. Estudio Integral”. Co-autora

VII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical (La Habana, 2007).

“*Cryptococcus gattii* en Cuba?” Autora

VI Congreso Latinoamericano de Micología (Mar del Plata, 2008).

“Criptococosis en Cuba”. Autora

Congreso 70 Aniversario del IPK / VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología / IV Congreso Nacional de Medicina Tropical (La Habana, 2009).

“Micosis emergentes y re-emergentes, una amenaza permanente”. Autora

“Caracterización de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con meningitis recurrente”. Autora

4th Trends in Medical Mycology (Atenas, 2009)

“Characterization of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis”. Autora

“Molecular characterization of environmental *Cryptococcus* isolates from Cuba”. Autora

XV Congreso Científico Internacional Centro Nacional de Investigaciones Científicas (La Habana, 2010)

“Molecular characterization of environmental *Cryptococcus* isolates from Cuba”. Autora

10mo Congreso Nacional de la Federación Italiana de Micología (FIMUA) / 2do Taller de la Confederación Europea de Micología Médica (ECMM) (Milano, 2010).

“What is the source of cryptococcosis in Cuban patients?” Autora

VII Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos (La Habana, 2010)

“De dónde los pacientes cubanos adquieren cryptococcosis?” Autora

RECONOCIMIENTOS Y PREMIACIONES

¿Existe resistencia *in vitro* a los antifúngicos en aislamientos cubanos de *Cryptococcus*?

Autora principal

- Resultado Relevante Institucional (IPK, 2008)
- Fórum de Ciencia y Técnica (IPK, 2009)

Criptococosis y su agente causal. Aportes a su epidemiología y patogenia. Autora principal

- Resultado Relevante Institucional (IPK 2010)
- Logro de la Academia de Ciencias de Cuba (2011)
- Premio Anual de Salud 2011 (Categoría Investigación Básica) Nivel Central y Nacional
- Fórum de Ciencia y Técnica 2011. Nivel de base, Municipal y Destacado Provincial.

TESIS

“Identificación de levaduras del complejo *Cryptococcus neoformans* en diferentes especies de árboles en la Ciudad de La Habana” (Tesis de Diploma Facultad de Biología, Universidad de La Habana; 2009) -Tutora

PROYECTO RAMAL MINSAP

“Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus* a partir de fuentes naturales” (Autora principal) 2006 -2011.

2. NO RELACIONADAS DIRECTAMENTE CON EL TEMA DE LA TESIS

PUBLICACIONES

- Fernández CM, González M, Illnait MT, Martínez GF. Concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. Rev Cub Med Trop 1998; 50 (1): 48-53.
- Illnait MT, Martínez GF, Fernández CM. Producción de IgG anti-*Cryptococcus neoformans*. Rev Cub Med Trop 1998; 50 (1): 27-30.
- Fernández CM, Martínez GF, Illnait MT, Perurena MR, González M. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* identificación en muestras clínicas cubanas. Rev Cub Med Trop 1998; 50 (2):167-9.
- Illnait MT, Vilaseca JC, Fernández CM, Martínez GF. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of *Cryptococcus neoformans* antigen. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96 (2): 241-5.
- Illnait MT, Valdés IC, Martínez GF, Fernández CM. Criptococosis. Una alerta necesaria. Rev Cub Med Trop 2001; 53 (3): 224-5.
- Martínez GF, Illnait MT. Micosis oportunistas en pacientes con sida. En Microbiología y Parasitología Medicas Sección IV, Tomo I, Editorial Ciencias Médicas 2001 p. 541-50.
- Valdés IC, Martínez GF, Fernández CM, Illnait MT. Pigmentación de *Cryptococcus neoformans* en agar semilla de girasol. Rev Cub Med Trop 2003; 55 (2): 119-20.
- Fernández CM, Martínez A, Echemendia Y, Martínez GF, Perurena MR, Illnait MT. Susceptibilidad *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* frente a anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Rev Cub Med Trop 2003; 55(2): 76-82.
- Martínez GF, Barrial L, Illnait MT, Valdés IC, Fernández CM, Perurena MR, Polo JL, Mendoza D. Utilidad de la D-proline en la diferenciación de variedades de *Cryptococcus neoformans*. Rev Cub Med Trop 2004; 56 (1): 77-9.
- Illnait MT, Miranda Y, Valdés I, Martínez GF, Fernández CM. Obtención de antisueros específicos para la serotipificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Rev Cub Med Trop 2004; 56 (2): 142-4.
- Illnait MT, Valdés IC, Fernández CM, Perurena MR, Martínez GF. Determinación de la LD₅₀ en cepas de *Cryptococcus neoformans* utilizando diferentes vías de inoculación. Rev Panam Infectol 2004; 6 (1): 8-11.
- Illnait MT, Tamargo I, Martínez GF, Fuentes K, Valdés IC, Rodríguez F. Infección del sistema nervioso central por *Cryptococcus neoformans* y *Streptococcus pneumoniae* en un paciente seronegativo al VIH. Rev Panam Infectol 2004; 6 (2):54-6.
- Prieto LM, Illnait MT, Ramos E, Cantelar N, Manssur J, Martínez GF. Candidiasis oral en pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA. Aspectos clínicos, micológicos y terapéuticos. Rev Cubana Med Trop 2006; 58 (3).

- Fernández CM, Martínez GF, Illnait MT, Perurena MR, Águila A, Brito M. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Candida* frente a fluconazol y anfotericina B. Rev Cubana Med Trop. 2007; 59 (2).
- Gato R, Martínez GF, Rodríguez H, Otero A, Sarracent J, Illnait MT. Reconocimiento de células intactas de *Cryptococcus neoformans* por el AcM 4B3 antiglicuronoxilomanano. Rev Cub Med Trop 2006; 58 (2): 162-4.
- Verduyyn FM, Curf-Breuker I, Illnait MT, Meis JFG. Fluconazole- en voriconazolgevoegheid van klinische gistisolaten. Resulten van negen jaar Nijmeegs onderzoek. Netherlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie 2008; 1: 12-9.
- de Barros JD; Nogueira SM; Silva FJ; Dos Santos RF; Sousa V; Theelen B; Boekhout T; Illnait MT; Guimarães MN; Conceição M; Lins MG; Barreto MT. *Kodamaea* (*Pichia*) *ohmeri* fungemia in a pediatric patient admitted in a public hospital. Medical Mycology 2009; 47 (7): 775-9.
- Fernández CM, Martínez GF, Illnait TM, Perurena MR. Histoplasmosis animal. Actualización. CubaZoo 2009; 19 (2): 45-54.
- Illnait MT, Illnait J, Blanco A. Efecto antifúngico de un extracto de *Petiveria alliacea* L. Rev CENIC de Ciencias Biológicas 2010; 41 (1): 79-82.
- Fernández CM, Martínez GF, Illnait MT, Perurena MR, González L. Brotes de histoplasmosis ocupacional en la provincia La Habana. Rev Cubana Med Trop 2010; 62 (1): 68-72.
- 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 (3): 257-60.
- Prieto-Santa Anna LM, Díaz LA, Illnait MT, Perurena MR, Cantelar N, Fernández CM, Martínez GF. Susceptibilidad a la nistatina de aislamientos bucales de *Candida* y su correlación con la respuesta al tratamiento. Rev Cubana Med Trop 2010; 62 (3):237-44.
- Najafzadeh MJ, Badali H, Illnait MT, de Hoog GS, Meis JF. *In vitro* activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea*. Antimicrob. Agents Chemother 2010; 54 (4): 1636-1638.
- Hagen F, Illnait MT, Bartlet KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH, Boekhout T, Meis JF. *In vitro* antifungal susceptibilities and AFLP genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2010; doi:10.1128/AAC.00746-10.
- Illnait MT, Hagen F, Fernández CM, Martínez GF, Polo JL, Boekhout T, Klaassen CH, Meis JF. Reactivation of a *Cryptococcus gattii* infection in a cheetah (*Acinonyx jubatus*) held in the National Zoo, Havana, Cuba. Mycoses. 2011; doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02046.

- Illnait MT, Gato R, Martínez FG, Otero A, Sarracent J, Rodríguez H, Fernández CM, Valdés IC. Efecto del anticuerpo monoclonal 4B3 en la infección experimental por *Cryptococcus neoformans*. Revista Rev Cubana Med Trop 2011; 63 (2): 123-9.
 - Fernández CM, Illnait MT, Martínez GF, Perurena MR, Monroy EX. Una actualización acerca de histoplasmosis. Trabajo de Revisión. Rev Cubana Med Trop 2011; 63 (3):188-205.

EVENTOS

Ha presentado más de 120 trabajos como autora y coautora en más de 50 eventos nacionales e internacionales.

A continuación se relacionan los trabajos más relevantes presentados en los últimos cinco años:

X Congreso Argentino de Micología (Buenos Aires; 2005)

“Estudio de cepas de *Candida albicans* por métodos genotípicos y fenotípicos”. Co-autora

3rd Trends in Medical Mycology (Torino; 2007)

“First report of *Cryptococcus gattii* environmental isolates in Cuba”. Autora

Scientific meeting of the Netherlands Society for Medical Mycology (Maastricht; 2008)

“Dermafinder: a new approach for fast and sensitive detection of dermatophyte skin infection”. Co-autora

4th Trends in Medical Mycology (Atenas; 2009)

“Evaluation of the antimycotic effect of *Petiveria alliacea* L”. Autora

“*In vitro* activities of eight antifungal drugs against 307 *Cryptococcus gattii* isolates” Co-autora

Medical Microbiology (Papendal; 2010).

“*In vitro* activities of eight antifungal drugs against 350 *Cryptococcus gattii* isolates classified by AFLP” Co-autora

XV International Congress of National Center of Scientific Research (La Habana; 2010)

“Comparative study of measure visual and spectrophotometer lectures in an *in vitro* antifungal susceptibility testing in *Candida* isolates from HIV-infected patients” Co-autora

“Environmental *Histoplasma capsulatum* isolation in Cuba. Risks and prevention of histoplasmosis” Co-autora

“Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extraction by PCR” Co-autora

XX National Congress of Human and Animal Mycology. Italian Federation (FIMUA) / II Workshop European Confederation of Medical Mycology (Milano; 2010)

“Characterization of a *Cryptococcus gattii* isolate from *Acinonyx jubatus* (cheetah) at the national zoo, Havana, Cuba” Autora

7mo Congreso de Inmunología (La Habana; 2011)

“Perfil de citoquinas en células mononucleares humanas de sangre periférica estimuladas por cepas de *Cryptococcus neoformans* clínicas y ambientales” Autora

Spring Meeting Dutch Soc for Med Microbiol (Arnhem; 2011)

“Epidemiology and genetic diversity of Dutch *Cryptococcus neoformans* isolates investigated by AFLP, microsatellite typing and *in vitro* antifungal susceptibility testing”

Co-autora

8th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (8th ICC) (Charleston; 2011)

“Epidemiology and genetic diversity of Dutch *Cryptococcus neoformans* isolates investigated by AFLP microsatellite typing and *in vitro* antifungal susceptibility testing”

Co-autora

V Trends in Medical Mycology (Valencia; 2011) Delegada

“Antifungal effects of a hydroalcoholic extract of *Petiveria alliacea* L on clinical *Candida* spp.” (Autora)

TESIS

“Diagnóstico de laboratorio de las micosis” (Trabajo para Optar por el Grado de Técnico en Química Industrial; 1998) -Tutora

Autor: Zuleyma Caballero Martínez

“Estudio de las variedades de *Cryptococcus neoformans* en Cuba. Correlación de la producción de fenoxidasa con la patogenicidad en un modelo animal” (Trabajo de Diploma de la Facultad de Biología. Especialidad en Microbiología; 1998) -Tutora

Autor: Iliana Valdés Hernández

“Obtención de antiseros específicos para la serotipificación de cepas ambientales de *Cryptococcus neoformans* aisladas en Ciudad de La Habana” (Trabajo de Diploma de la Facultad de Biología. Especialidad en Microbiología, UH; 1999) -Tutora

Autor: Yoel Miranda Toirac

“Contribución al estudio de la criptococosis infantil en Cuba” (Tesis para título de Master en Bacteriología-Micología; 2000) -Tutora

Autor: Dra. Rosaura F. Escobar Aragón

“Efecto del anticuerpo monoclonal 4B3 en la infección experimental por *Cryptococcus neoformans*” (Trabajo de Terminación de Residencia; 2000) -Tutora

Autor: Dr. René Gato Armas

“Prevalencia de *Cryptococcus neoformans* en los palomares registrados en Ciudad de La Habana” (Trabajo de Terminación de Residencia; 2000) -Asesora

Autor: Miguel Brito Gallosos

“Evaluación de la toxicidad aguda del anticuerpo monoclonal 4B3 en ratones BALB/c” (Tesis para optar por el título de Master en Bacteriología-Micología; 2003) -Tutora

Autor: Dr. René Gato Armas

“Criptococosis murina experimental. Propuesta de un modelo” (Tesis para optar por el título de Master en Bacteriología-Micología; 2003) -Tutora

Autor: Lic Iliana Valdés Hernández

“Desarrollo de un sistema de diagnóstico rápido para la criptococosis” (Trabajo de Diploma Facultad de Biología de La Universidad de La Habana; 2004) -Tutora

Autora: Yeised de La Fe.

"Susceptibilidad a itraconazol y ketoconazol de aislamientos orales de *Candida* en pacientes con sida" (Trabajo de Diploma Facultad de Biología de La Universidad de La Habana; 2005) -Tutora

Autor: Luis Enrique Jerez Puebla

"Susceptibilidad *in vitro* a nistatina de aislamientos bucales de *Candida* en pacientes seropositivos al VIH y pacientes con SIDA" (Trabajo de Diploma de La Universidad de La Habana, 2006) -Tutora

Autor: Luis A. Díaz Suárez

“Susceptibilidad *in vitro* frente a tres azoles en aislamientos de *Candida* de pacientes infectados por el VIH/sida” (Trabajo para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología; 2008) -Tutora

Autor: Lic. Luis Enrique Jerez Puebla

“Estado actual y sistematización de la conservación de cultivos en la Micoteca del IPK. (Tesis en opción al título de Máster en Bacteriología-Micología; 2010) -Asesora

Autor: Lic. Luis A. Díaz Suárez

“Efecto antifúngico de un extracto de *Petiveria alliacea* L en aislamientos clínicos de *Candida* spp.” (Trabajo de Terminación de Residencia; 2012) -Tutora

Autor: Dra. Rosario Esperanza Velar Martínez

OTROS PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS

- La micoteca del IPK. Un valioso aporte al desarrollo de la micología médica. Fernández CM, Martínez GF, Perurena MR, Illnait MT, Vilaseca JC. Resultado Relevante Institucional (1998).
- Determinación de la sensibilidad de levaduras de importancia médica. Fernández CM, González M, Martínez GF, Sánchez A, Pimentel T, Illnait MT, Bernal M. Resultado Relevante Institucional (1999).
- Un Nuevo método de extracción de ADN de *Candida albicans* utilizando la resina Chelex 100. Bernal M, Martínez GF, Illnait MT, González M. Resultado Relevante Institucional (1999).
- Contribución al conocimiento de la Histoplasmosis en Cuba. Fernández CM, Martínez GF, Illnait MT, Mendoza D, Fernández R, Cruz de Paz R. Resultado Relevante Institucional (1999).
- Desarrollo de una herramienta útil para la detección y cuantificación de antígeno de *Cryptococcus neoformans* en muestras clínicas. Illnait MT, Martínez GF, Vilaseca JC, Fernández CM, Perurena MR, Mendoza D. Resultado Relevante Institucional (2000).
- Microbiología y Parasitología Médica. Llop A, Valdés M, Zuaso J y colectivo de autores. Premio de la Crítica Científico-Técnica (2001); Trabajo Relevante en el XIV Fórum de Ciencia y Técnica. Premio Anual de Salud en categoría de “Libro” (2002).
- Criptococcosis in Cuba. Estudio integral. Martínez GF, Illnait MT, Fernández CM, Valdés IC, Perurena MR, Mendoza D, Llop A, Pérez J, Rodríguez F, Millán JC, Brito M, Fernández M, Rabelo Y, Escobar R, Asín O, Gato R, Toraño G, Miranda Y, de la Fé Y, Polo JL. Resultado Relevante Institucional (2004), Logro de la Academia de Ciencias de Cuba (2004), Ponencia Destacada, XXV Edición Fórum de Ciencia y Técnica (2007).
- Retos y perspectivas de la Microbiología. N Cantelar, GF Martínez, MF Pérez, D Domínguez, Á Valdivia, MT Illnait, D Ginorio, M Rodríguez, MI Chao, B Cantelar. Resultado Relevante Institucional (2004)
- Colección y mantenimiento de microorganismos en el cultivo de los cítricos. RI. Cabrera, GF Martínez, MT Illnait, IC Valdés, CM. Fernández. Premio Organismo MINAGRI (2004)
- Medallas 60 y 70 Aniversario del IPK (1999 y 2010 respectivamente)

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Principales características de las especies pertenecientes al complejo <i>C. neoformans</i> (Casadevall y Perfect, 1998, Perfect, 2006; de Hoog <i>et al.</i> , 2009).				
Características	<i>C. neoformans</i> ⁽¹⁾		<i>C. gattii</i>	
Teleomorfo	<i>Filobasidiella neoformans</i>		<i>Filobasidiella bacillispora</i>	
Variedades (serotipos)	var <i>grubii</i> (A)	var. <i>neoformans</i> (D)	ser. B	ser. C y D
Reacción con los antisueros ⁽²⁾	1, 2, 3 y 7	1, 2, 3 y 8	1, 2, 4 y 5	1, 4 y 6
Producción de filamentación durante el apareamiento ⁽³⁾	si	si	si	
Producción de filamentos de forma espontánea ⁽⁴⁾	no	si	no	
Producción de pseudohifas ⁽⁵⁾	si	si	no	
No. promedio de cromosomas	12,1	12,8	13	
Distribución geográfica	Mundial	Norte de Europa	Climas tropical y subtropical (Australia, África meridional, Centroamérica, California). Costa occidental de Norteamérica	

Anexos

Anexo 1. Principales características de las especies pertenecientes al complejo <i>C. neoformans</i> (Continuación).			
Características	<i>C. neoformans</i> ⁽¹⁾		<i>C. gattii</i>
Grupos genéticos obtenidos mediante RFLP	VNI/VNII/ VNIII (híbrido AD)	VNIV	VGI/VGII/VGIII/VGIV
Grupos genéticos obtenidos mediante AFLP	1/1A/1B 3 (híbrido AD)	2	4/5/6/7
Principales reservorio	Excretas de aves y suelos ⁽⁶⁾		Detritos vegetales
Presencia de cápsula		si	si
Asimilación de inositol		si	si
Producción de fenoloxidasa		si	si
Producción de ureasa		si	si
Inhibición de ureasa por EDTA		si	no
Asimilación de D-prolina		no	si
Asimilación de malato		no	si
Asimilación de nitratos		no	si
Asimilación de creatinina		si	si
Inhibición de la creatinina desaminasa por NH ₃		si	no
Susceptibilidad a la cicloheximida 0,1 %		si	no
Susceptibilidad a la L-canavanina		si	no
Asimilación de glicina		10 – 20 %	100 %

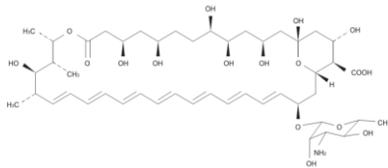
Anexo 1. Principales características de las especies pertenecientes al complejo *C. neoformans* (Continuación).

Características	<i>C. neoformans</i> ⁽¹⁾	<i>C. gattii</i>
Crecimiento a 37 °C	Sí	Débil
Factores de riesgo asociados	Inmunosupresión	Exposición a fuentes ambientales, hábito de fumar, antecedentes de cáncer, etc
Principales manifestaciones clínicas asociadas:		
Compromiso pulmonar	25 – 50 %	50 – 75 %
Criptococemia	25 – 50 %	0 – 25 %
Compromiso neurológico	0 – 25 %	25 – 50 %
Secuelas neurológicas	0 – 25 %	25 – 50 %
Compromiso de otros órganos	Piel, ojo, tracto genitourinario	Piel, ojo, tracto genitourinario
Mortalidad	25 – 50 %	50 – 75 %
<p>(1) Además incluye es serotipo AD el cual comparte las características de los serotipos A y D.</p> <p>(2) Basado en la clasificación de Ikeda <i>et al.</i>, 1996.</p> <p>(3) Después del apareamiento entre células MATα y MATα bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad, se inicia la transición hacia la formación de filamentos con estructuras que comunican las células vecinas y la dilatación del extremo distal de la hifa aérea de donde posteriormente brotan cuatro cadenas de basidiosporas (Lin, 2009).</p> <p>(4) En ausencia de células parentales compatibles, también se pueden producir apareamiento, filamentación entre células compatibles del mismo tipo sexual (especialmente del tipo MATα) dando lugar a una fructificación monocariótica (Lin, 2009).</p> <p>(5) Forma intermedia entre la de una levadura y la de una hifa verdadera. Su morfología puede variar desde estructuras alargadas de la célula levaduriforme hasta la formación de estructuras parecidas a las hifas con septos. Estas estructuras atípicas fue primeramente observada en un co-cultivo de <i>C. neoformans</i> y <i>Acanthamoeba polyphaga</i> y posteriormente de forma ocasional en hospedadores humanos (Lin, 2009)</p> <p>(6) Fundamentalmente asociado a excretas de palomas domésticas (<i>Columba livia</i>) pero también de aves psitaciformes (papagayos, loros, cacatúas, cotorras, pericos), paseriformes (canarios, pinzones, cuclillos, cardenales, estorninos), galliformes (gallinas y pavos) y anseriformes (patos). También ha sido recuperado de otras fuentes naturales tales como el aire, frutas, leche, agua y detritos vegetales (Casaevall y Perfect, 1998; Kwon-Chung <i>et al.</i>, 2011)</p>		

Anexo 2. Clasificación taxonómica del complejo de especies <i>C. neoformans</i> (de Hoog <i>et al.</i> , 2008).		
División	Basidiomycota	
Clase	Hymenomycetes	
Orden	Tremellales	
Familia	Tremellaceae	
Género	<i>Filobasidiella</i>	
	<u>Teleomorfo</u>	<u>Anamorfo</u>
Especies	<i>F. bacillispora</i>	<i>Cryptococcus gattii</i> (serotipos B y C)
	<i>F. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Variedades		<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (serotipo D)
		<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (serotipo A)

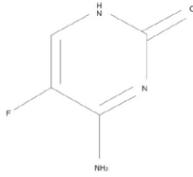
Anexo 3. Características de los antifúngicos incluidos en el presente estudio.
(Cuenca-Estrella, 2010; Morschhäuser, 2010; Thompson y Wiederhold, 2010; Türel, 2011)

Clase	Antifúngico	Características
Polienos	Anfotericina B	<p>Los polienos son moléculas macrólidas con cadenas insaturadas. Estos, se unen a todos los esteroides, aunque muestran mayor afinidad por el ergosterol que forma parte de la membrana fúngica lo que genera la formación de canales por los que la célula pierde iones y moléculas. También se une con esteroides intracelulares causando daños, principalmente en las vías de la respiración celular. Además, tiene efectos inmunomoduladores, ya que puede activar algunas funciones de los linfocitos, como la secreción de linfocinas.</p> <p>Presenta escasa biodisponibilidad digestiva, baja solubilidad en agua y elevada toxicidad. A pesar de estas desventajas, se licenció como fármaco de uso clínico, siendo el primer y casi único tratamiento eficaz de las infecciones fúngicas sistémicas hasta mediados del siglo XX.</p> <p>A pesar de que la mayoría de los nuevos antifúngicos comercializados tienen un amplio rango de acción, esta droga sigue siendo la de mayor espectro, al mostrar actividad fungicida frente a patógenos primarios u oportunistas tanto levaduriformes como filamentosos.</p> <p>A pesar de su amplio uso, pocas especies muestran resistencia intrínseca (<i>Aspergillus terreus</i>, <i>Trichosporon asahii</i>, <i>Scedosporium</i> spp., <i>Paecilomyces lilacinus</i> y <i>Fusarium</i> spp.) y sólo excepcionalmente se ha detectado resistencia secundaria.</p> <p>Los mecanismos de resistencia a esta droga, son poco conocidos, aunque la mayor parte de ellos están relacionados con un descenso en la cantidad de ergosterol de la membrana o un aumento de los fosfolípidos que reduce la interacción del fármaco con los esteroides. Estas alteraciones se han asociado con mutaciones en los genes <i>ERG2</i> o <i>ERG3</i>, que codifican enzimas que participan en la vía de síntesis del ergosterol. En los últimos años, se han propuesto otros mecanismos de resistencia relacionados con el efecto oxidativo que presenta el polieno en el interior celular. <i>A. terreus</i> y otros mohos muestran un aumento en la actividad de su catalasa, lo que podría colaborar a reducir el daño oxidativo originado por este antifúngico.</p>



Anexo 3. Características de los antifúngicos incluidos en el presente estudio (Continuación).

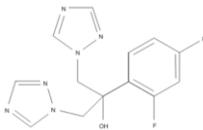
Pirimidinas 5-fluorocitosina



Es un fármaco fungistático que penetra en el interior de la célula fúngica tras contactar con la enzima de la membrana citosina permeasa. En el interior de la célula, la 5-fluorocitosina es desaminada a 5-fluoruracilo, tras lo que se producen varias modificaciones que acaban por generar ácido 5-fluoruradílico, el cual se incorpora a la cadena de ARN, y ocasiona la producción de ARN aberrante e inhibición celular. Su espectro de acción se reduce a las levaduras. No obstante, existen algunas cepas de *Candida* spp. y de *Cryptococcus* spp. que muestran resistencia primaria. Asimismo, cuando se utiliza en monoterapia, genera resistencia secundaria con facilidad, por lo que sólo se recomienda su utilización en forma combinada. La resistencia intrínseca a esta droga suele deberse a mutaciones en el gen que codifica la citosina desaminasa. La resistencia secundaria se produce por mutaciones en los genes que regulan la fosforilación de los productos derivados de la fluorocitosina.

Azoles (triazoles)

Fluconazol



Son moléculas sintéticas con un anillo de cinco carbonos unido a una cadena alifática con un grupo fenilo.

La familia de los triazoles se distingue de los imidazoles por presentar tres moléculas de nitrógeno en el anillo azólico (en lugar de dos) y por poseer una afinidad superior por las enzimas fúngicas *versus* las humanas, de ahí que muestren mucha menos toxicidad que los imidazoles, y puedan administrarse a dosis más elevadas.

La actividad antifúngica de estos fármacos reside en la capacidad de unirse con el grupo hemo, que forma parte de muchas de las enzimas implicadas en la síntesis de ergosterol, particularmente la 14-alfa demetilasa. Esta unión bloquea la síntesis de ergosterol, acumulándose esteroides 14-alfa metilo, lo que inhibe el crecimiento de la célula fúngica.

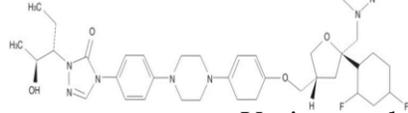
El perfil de actividad de los azoles es amplio, aunque depende de cada fármaco. Fluconazol tiene actividad frente a levaduras, pero no frente a los filamentosos. No obstante, algunas levaduras como *Candida krusei* muestran resistencia intrínseca y es frecuente que aparezcan resistencias secundarias en tratamientos prolongados con el fármaco.

Su excelente perfil farmacocinético y su escasa toxicidad han hecho que se utilice masivamente en algunos grupos de enfermos y parece que su difusión ha producido el desplazamiento de cepas sensibles, que han sido sustituidas por otras más resistentes.

Anexo 3. Características de los antifúngicos incluidos en el presente estudio (Continuación).

Azoles

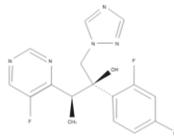
(triazoles, cont.)



Itraconazol

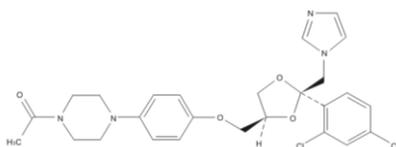
Itraconazol tiene un espectro de acción más amplio que fluconazol, ya que es activo frente a levaduras y algunos hongos miceliales. Ha sido demostrado que la mayoría de las levaduras resistentes a fluconazol acaban por desarrollar resistencia cruzada a itraconazol.

Voriconazol



Voriconazol fue desarrollado a partir de fluconazol con la intención de ampliar su espectro de acción. Su actividad *in vitro* es parecida a la de itraconazol, con un efecto fungicida adicional frente a la mayor parte de las cepas de *Aspergillus*. Se ha observado que los organismos resistentes a fluconazol, pueden desarrollar resistencia cruzada a voriconazol. Su utilización masiva en el tratamiento de la aspergilosis puede haber producido un desplazamiento de especies sensibles como *Aspergillus*, por otras con resistencia intrínseca como los Mucorales.

Posaconazol



Posaconazol es el último triazol comercializado hasta la fecha y es el de espectro más amplio, con actividad frente a levaduras y muchos hongos filamentosos, incluyendo los Mucorales. No existen muchos datos sobre las resistencias a este azol, pero se han comunicado resistencia cruzada en algunas cepas de *Candida* y *Aspergillus* con resistencia a otros azoles.

Isavuconazol

(Estructura química no disponible)

Isavuconazol es un nuevo triazol que se encuentra fase de desarrollo clínico. Tiene un perfil de actividad parecido al voriconazol, con actividad adicional frente algunas especies de Mucorales. Adicionalmente, ha mostrado tener ventajas potenciales en cuanto a su farmacodinámica e interacciones con otros medicamentos. Existe una formulación oral y otra parenteral y se está evaluando en el tratamiento de la candidiasis, de la aspergilosis y de otras micosis. De confirmarse los resultados preliminares de los estudios que están en marcha, se prevé que pudiera comercializarse en 2014. La 14-alfa lanosteroldemetilasa es producto del gen *ERG11* en levaduras, el cual es conocido como *CYP51* en hongos miceliales. La sobreexpresión del mismo, la amplificación genética debida a la duplicación cromosómica, conversión genética y recombinación mitótica dan lugar a enzimas alteradas, con un descenso en la afinidad por los azoles.

No obstante, el mecanismo de resistencia que se detecta con mayor frecuencia en cepas clínicas de levaduras y con menor frecuencia en hongos filamentosos, es la reducción de la concentración intracelular de los azoles. Esta reducción puede deberse a una disminución en la captación del fármaco o mucho más frecuentemente, a un aumento en la expulsión del azol por incremento en el número y en la actividad de las bombas de flujo o transportadores.

Anexo 4.

Descripción de los medios de cultivo

Medio mínimo de ácido caféico

Ácido caféico	0,18 g
Solución de citrato férrico 2 mM	4 mL
Agar noble	20 g
Agua destilada	1 000 mL

Se calentó y agitó hasta disolver completamente el agar, se esterilizó en autoclave (15 min a 121 °C) y se distribuyó en placas de Petri de 90 mm a razón de 20 mL/placa. Una vez solidificado el medio de cultivo, las placas fueron debidamente rotuladas y conservadas a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Agar Mueller Hinton modificado (con la siguiente formulación en g/L)

Infusión de carne	300 g
Peptona ácida de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	15 g
Agua destilada neutralizada (pH 7)	1 000 mL
glucosa	20 g
Azul de metileno (5 mg/mL de agua destilada)	100 µL

Todos los componentes se mezclaron mediante agitación y se aplicó calor hasta disolver completamente el agar. Se esterilizó en autoclave (15 min a 121 °C) y se atemperó hasta alcanzar 65 °C.

Posteriormente el medio se distribuyó en placas de Petri de 90 mm a razón de 20 mL/placa (altura de 4 mm) y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Las placas fueron debidamente rotuladas y conservadas a 4 °C hasta el momento de su utilización.

RPMI-1640 (con glutamina y rojo fenol y sin bicarbonato) (Sigma-Aldrich)

- Preparación para la prueba de microdilución en medio líquido

RPMI-1640	10,4 g
MOPS (0,165 mol/L)	1 000 mL

Se disolvió en frío mediante agitación mecánica, se ajustó el pH a $7,0 \pm 1$ con NaOH 10 M y se esterilizó por filtración.

- Preparación para la prueba de difusión en agar (Etest)

Solución A

RPMI-1640	10,4 g
MOPS	35,4 g
Glucosa	19 g
Agua destilada	500 mL

Se disolvieron los componentes en el agua y se ajustó el pH a 7. Se esterilizó por filtración y mantuvo en baño termostataado a 65 °C.

Solución B

BactoAgar	30 g
Agua destilada	500 mL

Todos los componentes se mezclaron y disolvieron mediante calentamiento. Una vez fundido el agar, se esterilizó en autoclave (15 min a 121 °C) y se atemperó hasta alcanzar 65 °C.

Una vez que las soluciones A y B alcanzaron los 65 °C, se mezclaron evitando la formación de burbujas y se distribuyeron en placas de Petri de 90 mm a razón de 20 mL/placa (altura de 4 mm). Solidificado el medio de cultivo, las placas fueron debidamente rotuladas y conservadas a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Anexo 5.

Representación esquemática de la preparación y disposición del inóculo, de las diferentes concentraciones de la batería de antifúngicos y los controles tanto de esterilidad como de crecimiento en la placa de microdilución para la determinación de las CIM mediante el método de referencia.

