

**LABORATORIO DE MICOLOGÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”. LA HABANA, CUBA**

**UNIVERSIDAD DE ESPECIALIDADES ESPÍRITU SANTO
GUAYAQUIL, ECUADOR**

**“NEUROCRÍPTOCOSIS. ASPECTOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES
VIH-SIDA. HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DE GUAYAQUIL.
DICIEMBRE 2013-ENERO 2015.”**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas

Autora: Dra. Sunny Sánchez Giler, M. Sc.

**La Habana
2018**

**LABORATORIO DE MICOLOGÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”. LA HABANA, CUBA**

**UNIVERSIDAD DE ESPECIALIDADES ESPÍRITU SANTO
GUAYAQUIL, ECUADOR**

**“NEUROCRÍPTOCOSIS. ASPECTOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES
VIH-SIDA. HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DE GUAYAQUIL.
DICIEMBRE 2013-ENERO 2015”**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas

Autora: Dra. Sunny Sánchez Giler, M. Sc.

Tutores: Dra. María Teresa Illnait Zaragoz, Dr. C.

Lic. Carlos M. Fernández Andreu, Dr. C.

**La Habana
2018**

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer primero que a nadie a mis padres, quienes con su ejemplo, sacrificio y esfuerzo me han impulsado cada día a tratar de enorgullecerlos. A mi hermana Nathalie, incansable guardiana del núcleo familiar e impulsadora del amor fraterno. A mi hermano David por demostrarme que siempre se puede ir más allá y que nunca debe vencer el temor a explorar nuevos horizontes. A mi cuñado Jerónimo por aceptarme, aconsejarme y regañarme.

A Dolores Zambrano, Lolita, por su apoyo incondicional en todos los aspectos.

A mi tutora, María Teresa Illnait, ferviente impulsadora de este trabajo. Te agradezco no sólo tu ayuda con este proyecto, sino tu apoyo anímico, tu soporte familiar, incluso involucrando a tus queridos padres por quienes siento un profundo afecto y admiración. Tus palabras siempre cálidas, amables y afectuosas; tus correos electrónicos tranquilizadores y atentos; tu comprensión infinita ante mis falencias y errores. No sólo he visto en ti a una tutora preocupada sino a una amiga incondicional y una mujer admirable y maravillosa en muchísimos aspectos.

A mi tutor, Dr. Carlos Fernández, por la ayuda y paciencia; por los comentarios acertados y de buen juicio, por el tacto y delicadeza ante mis disparates.

A la gente del IPK, profesionales e investigadores humildes y optimistas, siempre entregando lo mejor de sí mismos de manera generosa y desinteresada.

A Cuba, lleno de gente maravillosa y afectuosa, algunos de ellos que me brindaron su amistad y apoyo durante estos años en esta tierra cálida y alegre.

A Dios, por darme vida, salud y alegría.

DEDICATORIA

A las personas importantes de mi vida, mi esposo Jorge García y mis hijos, Victoria y Jorgito, por su apoyo y paciencia ante las ausencias.

SÍNTESIS

Antecedentes: La neurocriptococosis es una enfermedad definitoria de sida frecuente.

Objetivo: Determinar los aspectos clínicos y microbiológicos más relevantes de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil, Ecuador.

Metodología: Se estudiaron 81 pacientes VIH positivos con síndrome neurológico ingresados en el Hospital de Infectología entre diciembre 2013 y enero 2015. Se obtuvieron datos clínico-epidemiológicos y se realizó diagnóstico microbiológico a partir del líquido cefalorraquídeo mediante tinta China y cultivo. Se identificó especie con API® 20CAUX, serotipo/tipo de apareamiento por PCR, variedad molecular por RFLP-URA5 y susceptibilidad a los antifúngicos de primera línea de tratamiento mediante E-test. Se estudiaron 40 hisopados de ranuras de árboles aledaños al hospital mediante siembra en agar ácido-caféico.

Resultados: La prevalencia de coinfección *Cryptococcus*-VIH fue de 39,51%. Se caracterizó por fiebre, pérdida de peso, vómitos, cefalea y anemia. Los más afectados fueron los hombres entre 20 y 30 años. El 100% de los aislados correspondió a *C. neoformans* A α , VNI. Todos fueron sensibles a flucitosina y anfotericina B; el 93% mostró resistencia al fluconazol. No se recuperaron aislados a partir de muestras ambientales.

Conclusiones: Estos resultados constituyen el primer estudio integral de neurocriptococosis en Ecuador. Sus resultados contribuyen al manejo de los pacientes afectados.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	ADN	Ácido desoxirribonucleico
	ADS	Agar dextrosa de Sabouraud
	AFLP, de sus siglas en inglés	Análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados
	AAC	Agar ácido caféico
	Anf B	Anfotericina B
	ATCC, de sus siglas en inglés	Colección Estadounidense de Cultivos Tipos
C	CGB	L-canavanina-glicina-azul de bromotimol
	CIEC-ESPOL	Centro de Investigaciones Económicas de la Escuela Superior Politécnica de Ecuador
	CIM	Concentración inhibitoria mínima
	CIM ₅₀	Concentración mínima del antifúngico capaz de inhibir al 50 % del crecimiento del microorganismo en comparación con el control de crecimiento
	CIM ₉₀	Concentración mínima del antifúngico capaz de inhibir al 90 % del crecimiento del microorganismo en comparación con el control de crecimiento
	CLSI, de sus siglas en inglés	Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos
	CrAg, de sus siglas en inglés	Antígeno criptocócico
D	dNTP, de sus siglas en inglés	Desoxi(ribo)nucleótido trifosfato
E	EIA, de sus siglas en inglés	Ensayo inmunoenzimático
	EUCAST, de sus siglas en inglés	Comité Europeo para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
	EUA	Estados Unidos de América
F	FDA, de sus siglas en inglés	Administración de alimentos y medicamentos
	Flu	Fluconazol

I	IFN γ	Interferón gamma
	IL	Interleucina
	INSPI	Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación
	IRIS, de sus siglas en inglés	Síndrome inflamatorio de reconstitución inmune
L	LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	MALDI-TOF MS, de sus siglas en inglés	Espectrometría de masa del tiempo de vuelo de la matriz absorbida/ionizada con rayos laser
	MLST, de sus siglas en inglés	Tipificación de secuencias multilocus
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
	PBS, de sus siglas en inglés	Tampón fosfato
R	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
T	TARVAE	Terapia antirretroviral altamente efectiva
U	UEES	Universidad Espíritu Santo
V	VCE	Valores de corte epidemiológicos
	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

CONTROL SEMÁNTICO

Índice de Glasgow: Escala de aplicación neurológica que permite medir el nivel de conciencia de una persona. Evalúa tres parámetros:

- Apertura ocular: el puntaje puede ir desde 1 (si el paciente no responde en absoluto) hasta 4 (en el caso en que se produzca de manera espontánea).
- Respuesta verbal: los valores comienzan en 1 (si es nula) y llegan hasta 5 (si es orientada).
- Respuesta motora: la escala contempla valores del 1 (cuando no hay resultados) hasta 6 (la persona cumple las órdenes expresadas por la voz).

La suma de los tres valores constituye el resultado final de la escala de Glasgow. El puntaje más bajo que se puede obtener es 3 puntos, mientras que el valor más alto es 15 puntos.

El sistema de puntaje se propuso para la clasificación de los traumatismos craneoencefálicos basándose en el grado de severidad (leves de 13 a 15 puntos, moderados de 9 a 12 y severos 8 o menos). No obstante su aplicación ha trascendido y hoy se emplea en la evaluación de lesiones del encéfalo no traumáticas. Esto la convirtió en una de las más usadas en el campo de la neurocirugía y muchas otras ramas de la medicina, y en una herramienta útil para todo profesional de la salud.

Saprobiónico: Microorganismo asociado a la materia orgánica muerta o en descomposición. Su crecimiento depende del medio ambiente en que se encuentre (tipo de sustrato, temperatura, humedad, etc). Generalmente se refiere a los hongos.

Síndrome: Del griego συνδρομή syndromé, 'concurso'. Cuadro clínico o un conjunto sintomático que con cierto significado y que por sus propias características posee cierta identidad; es decir, un grupo significativo de síntomas y signos que concurren en tiempo y forma que pueden estar dados por varias causas o etiologías.

Síndrome inflamatorio de reconstitución inmune: Describe la inflamación que causa un empeoramiento paradójico de infecciones preexistentes o desenmascara infecciones subclínicas como consecuencia del inicio de la terapia antirretroviral en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana.

Síndrome neurológico infeccioso: Conjunto de síntomas y signos que caracterizan los procesos infecciosos que afectan el sistema nervioso. Entre las causas más frecuentes se describen las bacterias (*Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Neisseria meningitidis*), virus (VIH, enterovirus, virus del Nilo Occidental y virus de Zika), hongos (*Cryptococcus* y *Aspergillus*) y parásitos (*Plasmodium falciparum/vivax* y *Trypanosoma cruzii*). Los síntomas neurológicos pueden deberse a la infección en sí misma o a la respuesta inmunitaria. Según el área más afectada durante el proceso infeccioso se describen varios síndromes.

- Síndrome meníngeo: Caracterizado por fiebre, rigidez de nuca y columna con predominio cervical, posición antálgica en opistótonos o gatillo de fusil, cefalea intensa y raquialgia gravativas que se exacerba con los esfuerzos y los movimientos, fotofobia que exige que el paciente sea colocado en ambiente de penumbras, fonofobia (los ruidos son percibidos como dolorosos) e hiperalgesia general.
- Síndrome de hipertensión endocraneana: Caracterizado por fiebre, cefalea gravativa sobre todo matinal que no cede a los analgésicos comunes y el paciente adopta una posición de ortopnea a fin de mejorar su retorno venoso, edema papilar que se manifiesta por dilatación venosa y borramiento de los límites papilares, bradicardia (pulso por debajo de 60 por minuto), lentitud para responder, ideación lenta, parálisis del VI par (sin valor localizador) y constipación eventual.
- Síndrome cerebeloso: Caracterizado por fiebre, hipotonía, reflejos osteotendinosos disminuidos y de tipo pendular, fenómeno de rebote, ataxia o incoordinación de los movimientos voluntarios que da lugar a la aparición de hipermetría, asinergia, discronometría y adiadococinesia. La alteración del equilibrio y de la marcha provoca inestabilidad. Otras manifestaciones:

temblor intencional, palabra escandida, explosiva, nistagmus, fatigabilidad, etc.

- Síndromes de neuropatías periféricas: caracterizado por fiebre, paresias flácidas de predominio distal, bilaterales y simétricas con abolición de reflejos y trastornos autonómicos, impotencia sexual y tróficos, parestesias disestesias y alteraciones objetivas de sensibilidad, de predominio distal “en guante o bota”, dolor agudo lancinante, atrofia muscular y trastornos tróficos.

Valor de corte epidemiológicos: Es el valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) más elevada de un determinado antifúngico frente a los aislados salvajes. Se basa en la distribución de los valores de CMI de población salvaje sin mutaciones o mutaciones no detectables vs población no salvaje que alberga al menos un mecanismo de resistencia. Estos últimos muestran susceptibilidad disminuida en comparación con la población salvaje. En ausencia de valores de corte clínicos, éste puede indicar de forma temprana la emergencia de cambios en los patrones de susceptibilidad del microorganismo evaluado.

Tabla de contenido

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Preguntas de investigación	5
1.2. Objetivos	6
1.2.1. Objetivo general	6
1.2.2. Objetivos específicos.....	6
1.3. Novedad científica	6
1.4. Valor teórico.....	7
1.5. Valor práctico.....	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Agente etiológico	10
2.1.1. Taxonomía.....	10
2.1.2. Morfología.....	12
2.1.3. Identificación por métodos convencionales	13
2.1.4. Caracterización molecular	16
2.1.5. Susceptibilidad antifúngica	18
2.2. Ecología de <i>Cryptococcus</i>	19
2.3. Criptococosis.....	20
2.3.1. Patogenia de la infección.....	20
2.3.2. Principales aspectos clínicos de la neurocriptococosis	21
2.3.3. Diagnóstico de laboratorio de la infección.....	22
2.3.4. Tratamiento.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Tipo de estudio y marco de la investigación.....	28

3.2.	Universo y muestra	29
3.2.1.	Criterios de selección de los pacientes	29
3.2.2.	Criterios de selección de los árboles para la toma de muestra ambiental	29
3.3.	Procedimientos de trabajo	30
3.3.1.	Procedimiento para la recolección de datos, toma muestra de LCR y su procesamiento.	30
3.3.2.	Procedimiento para la toma de muestra de origen ambiental y su procesamiento	30
3.3.3.	Identificación y caracterización fenotípica de los aislados levaduriformes recuperados de las muestras de LCR y material vegetal	31
3.3.4.	Caracterización molecular de los aislados previamente identificados como <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	32
3.3.5.	Determinación de los patrones de susceptibilidad.....	33
3.4.	Análisis estadístico.....	35
3.5.	Aspectos éticos y legales.....	35
3.6.	Aspectos de bioseguridad.....	36
3.7.	Principales limitaciones del estudio	37
4.	RESULTADOS.....	39
4.1.	Datos generales de los pacientes objeto de estudio.....	39
4.2.	Prevalencia de criptococosis en síndrome neurológico infeccioso de los pacientes con VIH ingresados en el Hospital “Dr. José D. Rodríguez Maridueña” entre diciembre 2013 y enero 2015.....	42
4.3.	Datos clínicos de los pacientes del estudio con neurocriptococosis	43
4.4.	Patrones de susceptibilidad de los aislados de <i>C. neoformans</i> recuperados frente a los antifúngicos de primera línea del tratamiento	46
4.5.	Serotipo y tipo de apareamiento de los aislados de <i>Cryptococcus</i> recuperados de las muestras clínicas	46

4.6.	Aislamiento de <i>Cryptococcus</i> en muestras ambientales	47
5.	DISCUSIÓN	50
5.1.	Caracterización demográfica del universo de estudio.....	51
5.2.	Prevalencia de neurocriptococosis en pacientes seropositivos al VIH y sus principales características demográficas.	51
5.3.	Características clínicas y principales parámetros hematológicos de los individuos seropositivos al VIH con neurocriptococosis.....	54
5.4.	Aislamiento e identificación del agente causal	57
5.5.	Caracterización genética de los aislados recuperados.....	60
5.6.	Sensibilidad <i>in vitro</i>	63
5.7.	Recuperación de <i>Cryptococcus</i> a partir de fuentes naturales.....	70
	Discusión general.....	73
6.	CONCLUSIONES	83
7.	RECOMENDACIONES	85
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS	87
9.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA	113
10.	ANEXOS	109
	Anexo 1. Diagrama general de la metodología de la investigación abordada para el estudio de la neurocriptococosis en pacientes seropositivos al VIH en Guayaquil, Ecuador.....	110
	Anexo 2. Plantilla del consentimiento informado de los pacientes para participar en el estudio sobre los aspectos clínicos y microbiológicos de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.....	111
	Anexo 3. Ficha para la colecta de datos de los pacientes incluidos en el estudio sobre los aspectos clínicos y microbiológicos de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015..	112
	Anexo 4. Diagrama de trabajo para el aislamiento, identificación y caracterización de <i>Cryptococcus</i> recuperados a partir de muestras clínicas y ambientales	

en el marco del estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptocosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.	113
Anexo 5. Aval de la Comisión Científica Especializada de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” otorgado al protocolo de la investigación para el estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptocosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.	114
Anexo 6. Aval del Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” otorgado al protocolo de la investigación para el estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptocosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.	115
Anexo 7. Aval Comité de Bioética COBI-ASFORUM otorgado al protocolo de la investigación para el estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptocosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.	116
Anexo 8. Selección de la muestra de pacientes para el estudio de los aspectos clínicos, y microbiológicos de la neurocriptocosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.	117

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La meningitis criptocócica es una de las infecciones oportunistas más frecuentes en individuos con virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En países donde existe una alta prevalencia de esta última infección representa la causa más común de meningitis en pacientes adultos (Williamson et al., 2017).

A pesar del advenimiento de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) hace casi 30 años, las infecciones oportunistas del sistema nervioso central (SNC) persisten como una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con VIH. Existen varios factores que impactan negativamente sobre estos indicadores, entre ellas se destacan: el desconocimiento acerca del estado VIH-positivo, la resistencia a los fármacos antirretrovirales, la poca adherencia a este tratamiento y el uso de drogas recreativas: alcohol, anfetaminas, marihuana, cocaína; entre otros. Los patrones clínicos y radiológicos de las infecciones oportunistas del SNC en los pacientes con VIH suelen diferir de la presentación en los individuos inmunocompetentes. De forma adicional, la TARVAE puede desencadenar un empeoramiento paradójico de dichas infecciones causado por el síndrome inflamatorio de reconstitución inmune, conocido como IRIS, de sus siglas en inglés (Bowen, Smith, Reich, Quezado, y Nath, 2016).

En los países desarrollados el 10 % de los pacientes con VIH y meningitis criptocócica fallece en el transcurso de las 10 semanas posteriores al diagnóstico; esta cifra alcanza hasta el 50 % en los países en vías de desarrollo (Tenforde, Wake, Leeme, y Jarvis, 2016). Otros autores opinan que a pesar de la instauración del tratamiento antifúngico, la mayor parte de los fallecimientos por criptococosis meníngea se

producen en las primeras tres semanas posteriores al diagnóstico debido a una hipertensión endocraneana grave (Cox y Perfect, 2016).

Ecuador se encuentra entre los países de la región de las Américas con las tasas más altas de prevalencia de la infección por el VIH, 338 por 100 000 habitantes, lo cual representa la séptima causa de muerte general, con una tasa de mortalidad de 7,15 por 100 000 habitantes (OMS, 2014). El número de defunciones por el VIH que se registra en el año 2013 es de 762, de los cuales 423 pertenecen a la provincia del Guayas, 71 % son del género masculino. En ese mismo año, las defunciones debido a las infecciones oportunistas por VIH en Ecuador son de 72 % para el género masculino y 83,27 % ocurren en individuos con edades entre 15 y 49 años (Usiña y Carrera, 2013).

Durante 2007, el Centro de Investigaciones Económicas de la Escuela Superior Politécnica de Ecuador (CIEC-ESPOL), realiza un estudio sobre el impacto económico del VIH-sida en este país. El estudio demuestra la alteración que sufre el flujo de fondos del Estado, el cual destina 10 mil dólares a la atención de estos pacientes. Sumado a esto, se señala la pérdida de productividad de dichos individuos lo que afecta el producto interno bruto del país (M. Fernández, 2007).

De acuerdo a datos internacionales, las infecciones oportunistas tienen un alto impacto sobre la calidad y esperanza de vida de los pacientes con VIH (García y Novoa, 2011). Con frecuencia, algunas infecciones fúngicas son causa indirecta o directa de muerte en los enfermos con sida: la candidiasis bucofaríngea y la esofágica los conducen a la caquexia y al empeoramiento de su estado general con las complicaciones que esto conlleva; la criptococosis, la histoplasmosis y la neumocistosis por su parte, ocasionan *per se*, elevada morbimortalidad y evolución con tendencia a las recidivas (Alspaugh, 2015).

El principal agente causal de la criptococosis es el complejo de especies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Este comprende nueve tipos moleculares los cuales muestran correlación con las especies del complejo, sus variedades y serotipos. El conocimiento de la ubicación taxonómica exacta de este agente, permite realizar inferencias sobre su patogenicidad, patrones de virulencia, de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos de primera línea de tratamiento y otras características clínico-epidemiológicas de interés (Escandón y Montilla, 2010). No obstante, *C. neoformans* es

uno de los agentes infecciosos más frecuentes en los pacientes con VIH y otros individuos inmunocomprometidos (Worasilchai et al., 2016).

Hasta el momento, las cifras aportadas en trabajos internacionales, muestran que el 99 % de los aislados de *Cryptococcus* son susceptibles a la anfotericina B, a la flucitosina y al fluconazol, antifúngicos de elección en el tratamiento de la infección causada por este agente. Sin embargo, cada vez se registra con mayor frecuencia la emergencia de aislados con susceptibilidad disminuida frente a esos antifúngicos. Esta problemática hace imprescindible ejercer la vigilancia de la resistencia *in vitro* de los aislados del complejo *C. neoformans/C. gattii* (Bicmen, Doluca, Gulat, Gunduz, y Tuksavul, 2012; Worasilchai et al., 2016).

El estudio de la respuesta *in vitro* de las levaduras frente a los antifúngicos disponibles, es un reto y un elemento esencial para el desarrollo de las estrategias del tratamiento de la infección en los individuos con criptococosis. Recientemente se publicaron los valores de corte epidemiológicos (VCE) del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* frente a los antifúngicos empleados en la primera línea de tratamiento de esta infección y otros de más reciente generación. Esta variable se considera un indicador de la emergencia de cambios en los patrones de susceptibilidad de estos microorganismos frente a los agentes evaluados. En ausencia de valores de corte basados en los parámetros de la concentración inhibitoria mínima (CIM), la farmacocinética, la farmacodinámica, los estudios *in vivo* y la respuesta clínica al tratamiento, los VCE permiten el reconocimiento de la resistencia antifúngica. A pesar de la creciente importancia de este aspecto, los datos publicados al respecto procedentes de los países en vías de desarrollo son pobres o ignorados en comparación con los divulgados por los de mayor nivel de desarrollo (Espinel-Ingroff, Aller, et al., 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, et al., 2012).

En contraposición con la necesidad de conocer la susceptibilidad *in vitro* de los aislados, se encuentra la complejidad del método de microdilución en medio líquido, método de referencia para su determinación (CLSI, 2012). Esto trae como consecuencia el desarrollo de otras técnicas alternativas como el E-test, el Fungitel y el ATB Fungus entre otros, los cuales son de más fácil ejecución e interpretación. No obstante, la detección de un aislamiento resistente mediante estos últimos, requiere su confirmación a través del método de referencia (Lewis, Viale, y Kontoyiannis, 2012).

Las investigaciones publicadas sobre los principales aspectos relacionados con la criptococosis y el complejo *C. neoformans/C. gattii* en Ecuador son limitadas y hasta el momento las bases de datos biomédicas disponen de escasos trabajos (Chiang, Tettamanti, y Castro, 2011; Jarrín, Cordovez, y Vera, 2012; Ordoñez, Arias, y Parra, 2013; Tircio y Vallejo, 2014). Esto traduce el desconocimiento y la necesidad de investigar sobre esta temática en este país.

Aunque la infección criptococósica casi siempre se relaciona con la exposición a las excretas de palomas, en la actualidad se reconoce la existencia de diversas fuentes ambientales de su agente causal. Estudios moleculares demuestran que no siempre existe asociación entre los genotipos encontrados en las muestras de excretas de palomas y las obtenidas a partir de infecciones humanas, lo que soporta la existencia de otros nichos ecológicos como fuente de infección (Illnait-Zaragozi et al., 2010; Refojo et al., 2009).

Dada la relevancia práctica de los conocimientos sobre las características microbiológicas y medioambientales del complejo *C. neoformans/C. gattii*, el presente trabajo se plantea como propósito determinar las características más relevantes de la neurocriptococosis a partir de aislados recuperados de pacientes procedentes del Hospital de Infectología de Guayaquil, institución que atiende al 37 % de los pacientes con VIH-sida de Ecuador (Lugmaña, 2014) y la presencia de este agente en árboles aledaños al hospital. Los resultados de esta investigación permitirán establecer un conocimiento integral acerca de la situación de la coinfección con el complejo *C. neoformans/C. gattii* y VIH en Guayaquil, lo que contribuirá a un mejor manejo de los pacientes afectados.

1.1. Preguntas de investigación

¿Cómo se comporta la neurocriptococosis en los pacientes seropositivos al VIH que asisten al Hospital de Infectología de Guayaquil?

¿Cuáles son las principales características microbiológicas de su agente causal?

¿La neurocriptococosis en los pacientes seropositivos al VIH estará relacionada con la presencia de su agente causal en los árboles aledaños al Hospital?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Aportar al conocimiento general de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil, Ecuador a través del estudio de sus aspectos clínicos y microbiológicos más relevantes en pacientes hospitalizados en el Hospital de Infectología de dicha ciudad desde diciembre de 2013 hasta enero de 2015, así como posibles fuentes de infección en el entorno de esta unidad.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Describir los principales aspectos clínicoepidemiológicos de los pacientes con VIH y síndrome neurológico con la presencia de coinfección con *C. neoformans/C. gattii* en los mismos.
2. Identificar las especies, el serotipo y el tipo de apareamiento de los aislados de *Cryptococcus* causantes de neuroinfección en los pacientes objeto de estudio.
3. Determinar los patrones de susceptibilidad *in vitro* de los aislados del complejo *C. neoformans/C. gattii* frente a los antifúngicos empleados en la primera línea de tratamiento de la infección criptocócica.
4. Identificar la presencia de *Cryptococcus* en árboles aledaños al Hospital de Infectología de Guayaquil.

1.3. Novedad científica

Este constituye el trabajo de mayor alcance realizado hasta el momento en Ecuador al abordar de forma integral las diferentes aristas de la infección por *Cryptococcus* spp. en pacientes seropositivos al VIH en Guayaquil. El mismo permitió conocer su tasa de prevalencia y determinar por primera vez los serotipos y tipos de apareamiento de los aislados involucrados, así como los patrones de susceptibilidad antifúngica a los fármacos de primera línea para el tratamiento de esta infección.

1.4. Valor teórico

Los hallazgos del presente estudio contribuyen de forma importante a las bases teóricas del conocimiento acerca de la neurocriptococosis en pacientes seropositivos al VIH en Ecuador y aporta nuevas evidencias a las ya conocidas en Latinoamérica y el mundo.

1.5. Valor práctico

Los hallazgos de interés se hicieron saber a través de un informe técnico a la Dra. Jenny Marcillo, médico tratante del Hospital de Infectología, y fueron divulgados a través de publicaciones y trabajos presentados en eventos (ver en aparte correspondiente a producción científica de la autora). Los aportes de la presente investigación permitirán establecer medidas de intervención oportunas ante la sospecha de neurocriptococosis en individuos seropositivos al VIH y perfeccionar los protocolos de tratamiento en correspondencia con los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos, lo que repercutirá en el éxito de los tratamientos instaurados.

De manera general, todos estos elementos contribuirán a elevar la expectativa y calidad de vida en los pacientes seropositivos al VIH en Ecuador.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los antecedentes de estudios relacionados con la criptococosis y su agente causal en Ecuador se resumen a los que se describen a continuación. Chiang y cols., determinaron la positividad de la tinta china para el diagnóstico de criptococosis diseminada en muestras de orina de 42 pacientes con VIH del Hospital de Infectología de Guayaquil. Sus resultados demuestran la presencia de falsos negativos (11) y falsos positivos (3), y de forma importante la emergencia de esta micosis como la sexta causa de ingreso por infección oportunista y la cuarta de egreso. El 90 % de los pacientes presenta un síndrome neurológico y niveles de linfocitos T CD₄⁺ de 97,5 células/uL (Chiang et al., 2011).

En el año 2012, médicos del Hospital “Teodoro Maldonado Carbo” de Guayaquil, describen un caso de criptococoma cerebral en una paciente inmunocompetente. El diagnóstico se realiza mediante resonancia magnética nuclear y se confirma por tinta china a partir de una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) (Jarrín et al., 2012). Un año más tarde, Ordoñez y cols., publican un caso de linfadenitis criptococósica en paciente con VIH, quien se presenta con fiebre, cefalea, tos con expectoración blanquecina, linfadenitis cervical y dolor abdominal severo. El diagnóstico se obtiene mediante tinción de ácido peryódico de Schiff y Grocott del fragmento de biopsia de ganglio linfático cervical (Ordoñez et al., 2013). En ninguno de estos casos se recupera la levadura para su identificación y caracterización microbiológica.

En el repositorio de la Universidad de Guayaquil, consta el trabajo de Tircio, quien trata de determinar los factores de riesgo y las complicaciones asociadas a la criptococosis en

pacientes con VIH; sin embargo la estadística es discordante y la metodología incongruente por lo que sus resultados no son concluyentes (Tircio y Vallejo, 2014). Además, se refleja un estudio de aislamiento de *C. neoformans* var. *neoformans* a partir de excretas de palomas en la ciudad de Machala cuyos resultados no se encuentran disponibles (Valarezo, 2008).

2.1. Agente etiológico

2.1.1. Taxonomía

Con fines prácticos, se considera que *C. neoformans*/*C. gattii* es el único agente que de forma consistente produce la criptococosis (Kwon-Chung, Boekhout, Wickes, y Fell, 2011), específicamente por las especies *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D), *C. gattii* (serotipos B y C) y varios híbridos (serotipos AD, AB y BD) que hoy se reconocen como un complejo de especies (Bovers, Hagen, y Boekhout, 2008).

El conocimiento de la ubicación taxonómica exacta de este agente permite realizar inferencias sobre su patogenicidad, patrones de virulencia, de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos y otras características clínicoepidemiológicas de interés. A su vez, el conocimiento de los factores de virulencia es de gran importancia para determinar la gravedad y la evolución de la enfermedad en los pacientes afectados (Escandón y Montilla, 2010).

El complejo de especies *C. neoformans*/*C. gattii* presenta una fase asexual o anamorfa y otra sexual o teleomorfa. Atendiendo a su estado, varía su clasificación taxonómica. En la sexual se describen *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora*, que corresponden a los anamorfos de *C. neoformans* y *C. gattii*, respectivamente (Bovers et al., 2008). Estas se clasifican en el filo *Basidiomycota*, orden *Filobasidiales*, familia *Filobasidiaceae*, género *Filobasidiella* (Fonseca, Boekhout, y Fell, 2011; Kwon-Chung et al., 2011). (Fonseca et al., 2011)

En la actualidad existe una nueva propuesta de clasificación taxonómica basada fundamentalmente en los grupos genéticos que incluye siete especies: *Cryptococcus neoformans* (AFLP1/VNI, AFLP1A/VNII y AFLP1B/VNII), *Cryptococcus deneoformans* (AFLP2/VNIV), *Cryptococcus gattii* (AFLP4/VGI), *Cryptococcus*

bacillisporus (AFLP5/VGII), *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII), *Cryptococcus tetragattii* (AFLP7/VGIV) y *Cryptococcus decagattii* (AFLP10/VGIV y VGIIIc) (Hagen et al., 2015). Con independencia del tipo de clasificación, en más del 80 % de los pacientes la infección es causada por el serotipo A (Lin y Heitman, 2006) (tabla 1).

Tabla 1. Nomenclatura actual y propuestas para el complejo de especies *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*.

Nombre actual	Genotipo AFLP	Genotipo RFLP	Nombre propuesto
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (ser. A)	AFLP1 AFLP1A AFLP1B	VNI VNII	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (ser. D)	AFLP2	VNIV	<i>C. deneoformans</i>
Híbrido intervariedades <i>C. neoformans</i> (ser. AD)	AFLP3	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
<i>C. gattii</i> (ser. B y C)	AFLP4	VGI	<i>C. gattii</i>
	AFLP5	VGIII _(a,b,c)	<i>C. bacillisporus</i>
	AFLP6	VGII	<i>C. deuterogattii</i>
	AFLP7	VGIV	<i>C. tetragattii</i>
	AFLP10	VGIV/VGIII _c	<i>C. decagattii</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> x <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI	AFLP8	-	Híbrido <i>C. deneoformans</i> x <i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI	AFLP9	-	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>C. gattii</i> AFLP6/VGII	AFLP11	-	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deuterogattii</i>

AFLP, por sus siglas en inglés: análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados
RFLP, por sus siglas en inglés: análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

Adaptado de Lin y Heitman, 2006

Cryptococcus presenta dos tipos de apareamiento, a y α . Ambos pueden fusionarse en condiciones apropiadas de incubación y producir el estado teleomorfo del género, *Filobasidiella*. En un estudio acerca de la frecuencia de ocurrencia de este tipo de apareamiento en aislados ambientales y clínicos, se encontró que el tipo de apareamiento α es de 30 a 40 veces más frecuente que el a. Esto sugiere que el primero, aporta una ventaja selectiva en la supervivencia ambiental y posiblemente en la virulencia. En general, los aislados clínicos son haploides e invariablemente pertenecen a uno de los dos tipos de apareamiento (Fu, Sun, Billmyre, Roach, y Heitman, 2015; Lin y Heitman, 2006).

2.1.2. Morfología

El estado teleomórfico se reproduce por meiosis. Su morfología microscópica revela hifas dicarióticas delgadas, con septos que poseen un poro central o doliporo, conexiones en gancho y basidios subglobosos localizados en el ápice. Sobre estos se observan cuatro hileras de basidiosporas terminales, sésiles y en disposición catenulada (Fonseca et al., 2011; Kwon-Chung et al., 2011).

El estado anamorfo se reproduce por gemación y puede presentar una o más blastoconidias unidas a la célula madre mediante un cuello corto y estrecho. Presenta una forma redondeada u oval de 5 a 10 μm de diámetro rodeado de una cápsula mucilaginosa. Cada una presenta todas las estructuras y organelos de una célula eucariótica. Produce colonias mucoides blanquecinas en un periodo de dos a tres días (Fonseca et al., 2011; Kwon-Chung et al., 2011).

La levadura presenta una pared rígida constituida en esencia por glucanos y una cápsula compuesta por un polisacárido de alto peso molecular denominado glucuronoxilomanano (Ramírez, 2008). La talla de esta es variable y depende de las características genéticas del microorganismo y las condiciones en que se desarrolla la misma. Cuando hay desecación, la cápsula disminuye su tamaño hasta valores menores que 1 μm de diámetro, lo que permite su inhalación y llegar a los espacios alveolares; no obstante, la mayoría de los aislados, muestran cápsulas visibles de gran tamaño durante la infección (Maziarz y Perfect, 2016).

La adaptación al medio donde se desarrolla suele asociarse con variaciones fenotípicas y a la adquisición de atributos que contribuyen a su supervivencia en nichos ecológicos específicos. Estas adaptaciones proporcionan heterogeneidad entre diferentes poblaciones de células y facilitan la evasión de la respuesta inmune del hospedador. Estas incluyen: 1) las vías de transducción de señales que optimizan el metabolismo para responder a la disponibilidad de nutrientes, las condiciones de estrés y la interacción con otros sistemas biológicos (otros microorganismos, depredadores ambientales y anfitriones simbióticos) y 2) cambios morfológicos, así como desarrollo de estructuras especializadas que le proporcionan beneficios de supervivencia durante su ciclo de vida como el incremento del tamaño celular y el desarrollo de la cápsula que rodea su cuerpo celular. Esta última juega un papel importante en la vida de estos microorganismos pues les proporciona resistencia en condiciones de estrés como la deshidratación y además juega un papel clave en la interacción con el medio ambiente (Arenas, 2014; Phadke, Feretzaki, y Heitman, 2013; Sun y Heitman, 2015).

2.1.3. Identificación por métodos convencionales

El diagnóstico microbiológico de la criptococosis se basa en el examen microscópico directo de la muestra, el aislamiento de la levadura y su identificación mediante pruebas bioquímicas y serológicas (Arenas, 2014).

La identificación de *C. neoformans/C. gattii* en el laboratorio se basa en la presencia de levaduras en los productos patológicos, en el aspecto macro y microscópico del cultivo y en la determinación de algunas de las actividades de su metabolismo (Arenas, 2014; Fonseca et al., 2011).

Entre los productos patológicos más importantes para el aislamiento de *C. neoformans/C. gattii* se encuentran el LCR, la sangre, la orina, los lavados bronquio-alveolares, el tejido subcutáneo y el material de abscesos. Estos se procesan según los procedimientos descritos para estos fines (Bonifaz, 2012).

Examen directo con tinta china: esta técnica proporciona un resultado presuntivo de la presencia del hongo y es la técnica más utilizada para poner de manifiesto su cápsula. Existen modificaciones del método que permiten una mejor distinción del organismo; entre ellas está la adición de 2 % de cromato de mercurio a la tinta lo que permite una

observación mejor de las paredes capsulares y estructuras del interior del hongo (Zerpa, Huicho, y Guillen, 1996).

Aislamiento en ADS: *C. neoformans/C. gattii* tiene requerimientos nutricionales mínimos (una fuente simple de carbono y nitrógeno) y no necesita la adición de suplementos vitamínicos. En este sustrato (siempre que no contenga cicloheximida), *Cryptococcus* desarrolla colonias a partir de 48-72 horas de aspecto mucoso, brillante, convexas, de color blancoamarillento lo que le brinda aspecto de leche condensada. En algunas ocasiones pueden presentar sectores que difieren en su pigmentación. Su velocidad de crecimiento es variable; a 37 °C el tiempo de duplicación de la población varía desde 2,5 hasta 6 horas mientras a 40 °C se enlentece de forma significativa, las células sufren una vacuolización intracelular y producen patrones aberrantes tales como pseudohifas (Maziarz y Perfect, 2016).

Crecimiento en agar harina de maíz con Tween 80: este medio se emplea para el cultivo y diferenciación de especies de hongos según las características morfológicas que desarrollan sobre este sustrato. El Tween 80 se incorpora para favorecer la formación de clamidoconidias (Maziarz y Perfect, 2016). *Cryptococcus* en particular, se caracteriza por el desarrollo de blastosporas y ausencia de otras estructuras tales como micelio, pseudomicelio y clamidoconidias (Bonifaz, 2012).

Producción de enzima ureasa: esta prueba se fundamenta en la capacidad de producir ureasa, una enzima encargada de desdoblar la urea en dióxido de carbono y amonio, se incrementa el pH del medio y produce un cambio de color en el mismo. Entre las levaduras de importancia clínica, *Cryptococcus* es una de las pocas capaces de hidrolizar la urea, lo que la convierte en una prueba de diferenciación de gran utilidad (Ramírez, 2008). No obstante, en la literatura internacional se notifican aislados de *Cryptococcus* no productores de ureasa (Ruane, Walker, y George, 1988).

Producción de enzima fenoloxidasa: la presencia de esta enzima le brinda a *C. neoformans/C. gattii* la capacidad de sintetizar melanina a partir de compuestos difenólicos. Esta característica se considera uno de los marcadores fenotípicos de este complejo de especies. A diferencia de otros hongos melanogénicos, requiere de sustratos exógenos para la síntesis de este pigmento, característica empleada en el diseño de gran variedad de medios de cultivos con el objetivo de facilitar la

recuperación de este agente a partir de muestras con un alto grado de contaminación (Randhawa, Kowshik, y Khan, 2005). Uno de los más utilizados es el agar ácido caféico (AAC) por permitir la detección rápida y fácil de estas especies (Kidd et al., 2007). Esto ofrece ventaja durante su identificación presuntiva, en especial al procesar especímenes clínicos de sitios corporales no estériles (Ej. esputo) o muestras de origen saprófito (Kidd et al., 2007; Randhawa et al., 2005).

Asimilación de carbohidratos: esta prueba permite diferenciar las especies de levaduras según el patrón de asimilación de diferentes azúcares. Debido a que el método tradicional es trabajoso y consume tiempo, se desarrollan métodos comerciales que simplifican la manipulación y la interpretación de los resultados. Uno de los más difundidos en el mundo es el sistema de galería API[®] 20C AUX (bioMérieux SA, 2007) que incluye hasta 19 sustratos (Marcos y Pincus, 2013).

Crecimiento en agar L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB): este medio se emplea para diferenciar *C. neoformans* y *C. gattii*. La resistencia a bajas concentraciones de L-canavanina y de cicloheximida solo está presente en *C. gattii*. Esto le permite sobrevivir en el medio de cultivo que las contiene y asimilar la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno. Esto ocasiona acidificación del medio y cambio de color del indicador de pH de amarillo al azul cobalto (Kwon-Chung, Polacheck, y Bennett, 1982). Este criterio de diferenciación cuenta con el aval del análisis de múltiples aislados recuperados de muestras clínicas (Kidd et al., 2007; Lazera et al., 2000; Perez et al., 2008). En ocasiones, algunos aislados identificados como *C. gattii* mediante métodos moleculares, muestran una reacción negativa sobre este sustrato (McTaggart et al., 2011); otros autores señalan que entre el 30 y el 76 % de otras especies de *Cryptococcus* diferentes del complejo *C. neoformans/C. gattii* son capaces de desarrollar una reacción positiva sobre este agar (Illnait-Zaragozi et al., 2012; Tay, Na, y Tajuddin, 2008).

Otra forma de diferenciar ambas especies es la utilización del método auxanográfico para detectar la habilidad de *C. gattii* de asimilar la D-prolina y el D-triptófano como únicas fuentes de nitrógeno (Chaturvedi y Chaturvedi, 2011; McTaggart et al., 2011; Tay et al., 2008).

2.1.4. Caracterización molecular

Con frecuencia el diagnóstico de neurocriptococosis se basa en las evidencias clínico-epidemiológicas, la observación de levaduras capsuladas mediante el examen directo de la muestra, la detección de antígenos específicos, así como la recuperación e identificación del agente mediante métodos fisiológicos, bioquímicos o serológicos. Sin embargo, estos procedimientos tienen limitaciones que pueden falsear el diagnóstico (Huston y Mody, 2009).

Esto favorece el desarrollo de métodos moleculares útiles para la detección de genes específicos a partir de muestras clínicas del cultivo (Bovers et al., 2008). Estas herramientas permiten la identificación de las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* y otras descritas con menor frecuencia como *Cryptococcus laurentii*. Los métodos moleculares proporcionan 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 (Wengenack y Binnicker, 2009).

Uno de los métodos más empleados es el análisis del polimorfismo de los fragmentos de los genes amplificados y digeridos con endonucleasas (conocido como RFLP, por sus siglas en inglés). Entre los genes más estudiados está el que codifica para la pirofosforilasamonofosfato- orotidina (*URA5*) y la fosfolipasa B (*PLB1*). Por su parte las enzimas más empleadas para este propósito son la *Sau96I* y *HhaI* (Meyer, Castaneda, Jackson, Huynh, y Castaneda, 2003).

El estudio de las variaciones de la secuencia de nucleótidos de múltiples genes (conocido como MLST, por sus siglas en inglés) se propone como una técnica universal para el estudio molecular de los aislados de este complejo de especies (Meyer et al., 2003). La misma se usa de forma amplia para la determinación de genotipos circulantes en diferentes partes del mundo (Cogliati, 2013; Litvintseva, Thakur, Vilgalys, y Mitchell, 2006; Sidrim et al., 2010).

Otra de las herramientas empleadas es el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (conocido como AFLP, por sus siglas en inglés). Esta constituye una estrategia novedosa para generar marcadores moleculares de forma sencilla, económica, rápida y confiable. Por este motivo se convierte en el instrumento

molecular más conveniente para establecer la huella genética de aislados de cualquier origen o complejidad. Esta metodología facilita el análisis simultáneo de muchos *locus* al detectar un número mayor de marcadores de ácido desoxirribonucleico (ADN) polimórfico que cualquier otro método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (conocido como PCR, por sus siglas en inglés) (Montaño, Villalpando, y Vargas, 2006).

La técnica de AFLP detecta los cambios de tamaño de las distintas regiones o *loci* en el genoma y no requiere conocer la secuencia de éste. Debido a que estos marcadores se generan en condiciones de alta selectividad o astringencia, es menos probable que se presenten falsos positivos. La principal desventaja de la técnica es la baja sensibilidad para discernir la codominancia, requerir un equipo sensible o un programa informático especializado (Moen et al., 2004).

En general, las herramientas moleculares tienen una alta sensibilidad y especificidad para la detección de sus dianas y superan las limitaciones del diagnóstico convencional, pueden emplearse para la identificación y para estudios de epidemiología molecular (Leaw et al., 2006; Magee, Gale, Berman, y Davis, 2003).

Los estudios de epidemiología molecular demuestran que estas técnicas se pueden aplicar al diagnóstico de casos y a la detección rápida tanto de los serotipos como de los tipos moleculares del complejo de especies. Por ejemplo, en Seúl queda demostrado el predominio total de *C. neoformans* Aα variedad molecular VNI en un estudio que incluye 46 aislados (Park et al., 2009). De otra parte, en India de 57 aislados clínicos, 51 corresponden a *C. neoformans* var. *grubii*-VNI, uno a *C. neoformans* var. *neoformans*-VNIV y cinco a *C. gatti*-VGII (serotipos B y C) lo que demuestra la diversidad genética local (Jain et al., 2005). Dicha diversidad se pone de manifiesto en otras partes del mundo como en Brasil, donde de 82 aislados de *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) recuperados de 30 pacientes seropositivos al VIH se obtienen dos tipos de variedades moleculares: VNI y VNII (Igreja et al., 2004). Años más tarde en este mismo país se notifica que de 40 aislados clínicos el 75,5 % pertenecen a la variedad molecular VNI y el 22,5 % a VGII (Da Silva et al., 2012).

2.1.5. Susceptibilidad antifúngica

En la búsqueda de alternativas y opciones terapéuticas, se desarrollan pruebas para conocer los patrones de susceptibilidad de los agentes infecciosos a los antimicrobianos. Las mismas permiten evaluar la actividad *in vitro* de los agentes antifúngicos solos o combinados y con posterioridad correlacionar los resultados con la respuesta clínica. De esta forma se logra determinar, que el genotipo VGII es menos susceptible a la anfotericina B y que la combinación de fluconazol y terbinafina tiene un efecto sinérgico de 95,16 % frente a este hongo (Reichert-Lima et al., 2016).

En los laboratorios de microbiología clínica, uno de los métodos más utilizados para conocer los patrones de susceptibilidad *in vitro* son las tirillas de E-test. Estas están aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (en lo adelante FDA, por sus siglas en inglés y EUA, respectivamente) debido a su fácil manipulación y a la concordancia con el método de dilución en medio líquido, considerado el método de referencia (CLSI, 2012; Tapia, 2009).

En 1992 se establece el primer patrón internacional de susceptibilidad de levaduras, elaborado por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (conocido como NCCLS, por sus siglas en inglés) y en la actualidad denominado Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (en lo adelante, CLSI por sus siglas en inglés). El mismo se basa en un método de macrodilución en medio líquido que se adapta con posterioridad a la microdilución. Dicho método permite medir las CIMs de las principales especies de hongos oportunistas, incluyendo a *C. neoformans* con una adecuada reproducibilidad (Johnson, 2008). A pesar de su relativa complejidad, es considerado el método de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* frente a los antimicrobianos de manera general y se encuentra reflejado en documentos como el M27-A3 del CLSI y EDEF 7.2 del Comité Europeo para pruebas de susceptibilidad antimicrobianas (CLSI, 2012; Rodríguez et al., 2008).

Recientemente se proponen VCE para algunos antifúngicos. Estos distinguen entre los aislados salvajes (población de microorganismos susceptibles o con mecanismos de resistencia adquiridos no detectables) y no salvajes (que expresan mecanismos de resistencia adquiridos o por mutaciones) (Córdoba et al., 2016; Espinel-Ingroff, Aller, et al., 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, et al., 2012). A diferencia de estos, los puntos

de corte clínicos categorizan los aislados como susceptibles (tratables) o resistentes (no tratables) y se obtienen a partir de la distribución de la CIM, los parámetros de la farmacocinética y farmacodinamia, los modelos animales, así como los resultados terapéuticos (Turnidge, Kahlmeter, y Kronvall, 2006).

De manera independiente al tipo de valor de corte utilizado, las diferencias de sensibilidad entre los genotipos de *C. neoformans*/*C. gattii* son evidentes, de ahí la relevancia de conocer este dato para la decisión terapéutica (Reichert-Lima et al., 2016). Esto queda demostrado en el estudio de Córdoba et al., quienes informan el valor de corte más alto (que incluía a ≥ 95 %) para la flucitosina y el fluconazol (32 mg/mL ± 1) en cada caso, mientras que para la anfotericina B, el itraconazol, el voriconazol y el posaconazol los valores oscilan entre 0,5; 0,5; 0,5 y 0,06 mg/L, respectivamente (Córdoba et al., 2016).

2.2. Ecología de *Cryptococcus*

Los estudios de las fuentes ambientales, constituyen una herramienta útil para la realización de estudios epidemiológicos y moleculares. Estos contribuyen a determinar las posibles fuentes de infección y establecer los mecanismos de control que previenen la infección, en especial en individuos susceptibles (Cogliati et al., 2016).

Cryptococcus se encuentra distribuido en sustratos disímiles de la naturaleza (suelo, aire y agua) y gracias a sus mecanismos de adaptación conquistan casi todas las latitudes del planeta (Kwon-Chung et al., 2011). No obstante, de manera general predominan en climas cálidos y su principal reservorio son las excretas de aves y los detritos vegetales (Nnadi et al., 2016).

Existen numerosos estudios de epidemiología molecular encaminados a conocer la distribución de los diferentes genotipos. Uno de los más completos es el publicado por Meyer y Trilles (Meyer y Trilles, 2010) y entre los más recientes están los realizados en Nigeria y Brasil, con una importante contribución al conocimiento epidemiológico en sus respectivas regiones (Alves et al., 2016; Nnadi et al., 2016).

El eucalipto rojo es un árbol conocido y apreciado por los habitantes rurales y urbanos de Egipto. Su participación en la ecología de *C. neoformans* se encuentra ampliamente

documentada en un estudio que demuestra su prevalencia durante la época de floración del árbol (Elhariri, Hamza, Elhelw, y Refai, 2016).

A pesar de los esfuerzos realizados, no siempre es posible demostrar la fuente de infección de los pacientes (Illnait-Zaragozi et al., 2012) por lo que se debe insistir en este aspecto con el objetivo de conocer mejor la ecología de este agente e implementar las medidas adecuadas para el control de la infección.

2.3. Criptococosis

El complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* se reconoce como un agente oportunista habitual en los individuos inmunocomprometidos (Messina et al., 2014). Su relevancia médica aumenta el interés por esta levadura en la comunidad científica y el desarrollo de un número creciente de investigaciones en el ámbito mundial (Armstrong-James, Meintjes, y Brown, 2014).

2.3.1. Patogenia de la infección

C. neoformans/C. gattii generalmente penetra al cuerpo humano por inhalación de levaduras desecadas o esporas suspendidas en el aire (Arenas, 2014). La protección o susceptibilidad frente al hongo depende del desenlace de diversos factores derivados del patógeno y del hospedador, los cuales determinan finalmente el cuadro clínico y la evolución del sujeto (Wozniak, Olszewski, y Wormley, 2015).

En la mayoría de los casos, las partículas fúngicas se eliminan por los mecanismos de defensa del hospedador. No obstante, bajo determinadas condiciones (inmunosupresión, inhalación de agentes virulentos o de un gran número de partículas infecciosas) la infección puede progresar y ocasionar diseminación hacia el SNC. A este nivel, el hongo puede traspasar la barrera hematoencefálica mediante tres mecanismos principales: 1) diapédesis a través de los espacios intercelulares, 2) transcitosis de las células endoteliales y 3) fenómeno de “caballo de Troya”; en este último caso, recurre a los fagocitos como vehículos (Miyazato, 2016).

Entre otros factores, la predilección del hongo por el SNC depende de la presencia de altas concentraciones de precursores de la actividad de la enzima lacasa presente en el complejo *C. neoformans/C. gattii*. El cerebro contiene compuestos fenólicos como la

noradrenalina, el ácido 3,4-dihidroxifenil, el ácido homocanílico, el ácido 5-hidroxiindolacético, la serotonina y la dopamina (Nosanchuk, Rosas, Lee, y Casadevall, 2000). Este último, se relaciona con varias funciones sensoriales y motoras, por lo que es uno de los más abundantes en el cerebro, incluyendo los núcleos putamen y caudado, así como la sustancia gris. Estas áreas suelen ser de las más afectados por estas levaduras (Hurd, Suzuki, y Sedvall, 2001; Taylor-Smith y May, 2016).

En la respuesta del hospedador frente a *Cryptococcus* merece destacarse la participación de los componentes celulares de la inmunidad innata, los neutrófilos, los macrófagos y las células asesinas naturales (Aratani et al., 2006). Los linfocitos T CD₄⁺ sensibilizados estimulan la producción de citocinas proinflamatorias como INF γ , IL2, IL12, IL18, que dan origen a una respuesta con predominio de citocinas de tipo Th1. Esta genera la estimulación de los macrófagos y la producción de granulomas epitelioides compactos llamados a controlar la infección (Kawakami, Qifeng, Tohyama, Qureshi, y Saito, 1996).

2.3.2. Principales aspectos clínicos de la neurocriptococosis

En general las manifestaciones clínicas de la criptococosis dependen del sitio de infección. La más frecuente e importante debido a sus implicaciones clínicas y terapéuticas resulta la infección del SNC (Chayakulkeeree y Perfect, 2006).

Colombo y Rodríguez, la clasifican en diferentes síndromes: meningitis, encefalitis, meningoencefalitis, ventriculitis, aumento de la presión intracraneal y lesiones en el parénquima (Colombo y Rodrigues, 2015).

A diferencia de las meningitis bacterianas, en las causadas por esta levadura, los pacientes afectados presentan signos y síntomas de carácter crónico que incluyen cefalea, fiebre, letargia, déficits sensoriales y parálisis, entre otros; en tanto es frecuente la ausencia de irritación meníngea clásica (meningismo) (Colombo y Rodrigues, 2015; Kasper y Fauci, 2012; Lee, Dickson, y Casadevall, 1996). Las lesiones parenquimatosas se caracterizan por la formación de abscesos, quistes o granulomas que se conocen como criptococomas cuyas manifestaciones depende de la localización y extensión de la lesión (Jarrín et al., 2012; Lee et al., 1996).

Algunos individuos con infección por citomegalovirus, demencia asociada con el VIH e incluso la criptococosis, pueden presentar un examen neurológico normal. No obstante, la presencia de demencia subaguda, la pérdida de los sentidos de la vista y la audición, así como el letargo o excitación deben alertar hacia una evaluación más minuciosa (Zunt, 2002).

El diagnóstico diferencial debe realizarse con meningitis tuberculosa, neurosífilis, carcinomatosis meníngea, toxoplasmosis y encefalitis virales. Se tiene un alto índice de sospecha en pacientes con infección avanzada por el VIH (recuento de células $CD_4^+ < 100$ células/ μ L) que presenten fiebre y dolor de cabeza. En cada caso, la gravedad del cuadro dependerá del equilibrio entre la respuesta inmune del anfitrión y los mecanismos patogénicos producidos por la levadura (Chayakulkeeree y Perfect, 2006).

2.3.3. Diagnóstico de laboratorio de la infección

El diagnóstico se sospecha según la epidemiología y la clínica que presenta el paciente y se confirma mediante el aislamiento e identificación de *C. neoformans*/*C. gattii*. Las levaduras se pueden observar mediante un examen directo con tinta china, en el LCR, la orina u otros fluidos corporales. Esta prueba es positiva en el 50 % de los casos; en los pacientes con sida la detección aumenta al 75 % (Tsuji, Barbabosa, y Rivera, 2005). Sin embargo, pueden existir falsos positivos en presencia de otros agentes como *Rhodotorula*, *Candida*, *Klebsiella pneumoniae* o artefactos que pueden confundir el diagnóstico; y falsos negativos, en especial cuando el conteo de levaduras es menor de 10 000 células/mL o estas presentan cápsulas pequeñas (Tsuji et al., 2005).

La impresión inicial se confirma con el aislamiento e identificación del hongo según sus características morfológicas y fisiológicas. El medio de cultivo más empleado es el agar dextrosa de Sabouraud (en lo adelante ADS), sin cicloheximida. El examen microscópico de esta colonia releva la presencia de levaduras encapsuladas redondeadas con diámetro de 7 a 15 μ m (Tsuji et al., 2005). Aunque en ocasiones, el cultivo del LCR pudiera ser negativo en pacientes con neurocriptococosis, ésta constituye la prueba de oro para confirmar la afección. Por lo general, los falsos negativos se deben a la baja carga de levaduras o a la presencia de células poco viables (en especial en el curso de tratamientos antifúngicos) (Chayakulkeeree y Perfect, 2006; Perfect et al., 2010).

Algunos expertos sugieren que la presencia de anticuerpos séricos específicos confiere un signo de buen pronóstico y una mejor respuesta al tratamiento; sin embargo, su utilidad diagnóstica es baja debido a la pobre sensibilidad y especificidad de las pruebas diseñadas a este efecto (Chayakulkeeree y Perfect, 2006; Diamond y Bennett, 1974; Gordon y Vedder, 1966).

La presencia de polisacáridos capsulares permite el desarrollo de pruebas diagnósticas mediante la identificación de antígeno criptocócico (Kozel y Bauman, 2012). Su detección en el suero y LCR mediante aglutinación al látex e inmunoensayos enzimáticos (en lo adelante EIA, de sus siglas en inglés) está disponible desde hace más de 35 años (Perfect y Bicanic, 2015). La sensibilidad de las mismas varían desde 83 a 97 % llegando al 100 % en el LCR, en tanto que la especificidad se encuentra entre 93 y 98 % (Vidal y Boulware, 2015). En la actualidad se conoce que la aglutinación al látex tiene una sensibilidad reducida frente al serotipo C y los EIA frente a los serotipos C y D (Tintelnot et al., 2015). La tasa de falsos positivos es menor del 1 % y en general se explica por problemas técnicos o infecciones asociadas con otros hongos, Ej: *Trichosporon* spp., *Capnocytophaga canimorsus* y *Stomatococcus mucilaginosus*. Por su parte, los resultados falsos negativos suelen observarse durante las infecciones tempranas debido a la baja carga de hongos, con el fenómeno de prozona y a infecciones con levaduras poco encapsuladas (Antinori, 2013; Perfect y Bicanic, 2015). Otras limitaciones de estas metodologías están dadas por la subjetividad de la interpretación de los resultados en el caso de la prueba de aglutinación al látex, así como la mayor complejidad y la necesidad de equipos de laboratorio (lavador y lector) en el caso de los EIA. Esto hace que este último, sea inadecuado en entornos con mínima o ninguna infraestructura (Makadzange y McHugh, 2014).

Un enfoque diferente, la espectrofotometría de masas basada en el tiempo de vuelo de la matriz absorbida/ionizada con rayos laser (en lo adelante MALDI-TOF, por sus siglas en inglés), se basa en la identificación del patrón de proteínas de los diferentes microorganismos. Por comparación directa del patrón espectral del organismo en cuestión, con bases de datos de patrones conocidos de diferentes microorganismos, es posible identificar el género, la especie e incluso los niveles resistencia en determinados agentes (Hettick et al., 2008). A pesar de que esta técnica se describe por primera vez hace tres décadas, capta la atención de la comunidad científica en los últimos 10 años,

pues se evidencia su potencial, creando una revolución en los laboratorios microbiológicos (Seng et al., 2009). Hasta el momento se conocen cuatro sistemas comerciales basados en este método, de los cuales la FDA aprueba el primero para su uso en laboratorios de microbiología clínica. Su evaluación muestra resultados prometedores ya que es capaz de identificar hongos levaduriformes y miceliales a partir de cultivos positivos con rapidez con una concordancia superior al 90 % al compararla con los métodos convencionales (Bader et al., 2011; Hettick et al., 2008). En algunos informes, esta metodología parece incluso superar a las técnicas de identificación tradicionales (Bader et al., 2011; Iriart et al., 2012).

No obstante, requiere una etapa de extracción de proteínas antes del análisis espectrofotométrico, en especial cuando se trata de la identificación de hongos. Los sistemas más modernos, tales como el Vitek MS, logran superar esto mediante el uso de un paso único de lisis con ácido fórmico, por lo que la técnica es más rápida y fácil de usar (Iriart et al., 2012). Un estudio de intervención que incluye a 501 individuos con bacteriemia o candidemia, muestra que la espectrofotometría de masa basada en el MALDI-TOF es capaz de disminuir el tiempo para la identificación de organismos, lo que mejora la selección del agente antimicrobiano y el desenlace de los pacientes (Huang et al., 2013). Esta y otras evidencias sugieren que este es un método con potencialidades para reemplazar los convencionales de identificación de patógenos fúngicos; sin embargo, debido a que el período transcurrido desde su introducción en este campo es corto, resulta imprescindible contar con un mayor número de datos para llegar a una conclusión válida acerca de su relevancia clínica (Shin et al., 2013).

Con el desarrollo de la biología molecular, se diseñaron técnicas capaces de detectar agentes fúngicos a partir de muestras clínicas. Hoy se emplean fundamentalmente para la caracterización de estos agentes y estudios epidemiológicos tal como se detalla más adelante (Arvanitis, Anagnostou, Fuchs, Caliendo, y Mylonakis, 2014).

2.3.4. Tratamiento

Entre las enfermedades infecciosas, el tratamiento de la criptococosis es uno de los más estudiados; sin embargo, todavía quedan muchos aspectos al respecto por resolver. A pesar de los avances médicos, la tasa de mortalidad durante los tres primeros meses de tratamiento de la neurocriptococosis sobrepasa el 20 % y alcanza el 100 % en los

pacientes que no reciben tratamiento oportuno (Perfect et al., 2010). Los datos publicados hasta el momento coinciden en que la respuesta a la terapia convencional de la criptococosis es poco predecible y las recurrencias son comunes. Entre el 60 y el 70 % de los pacientes responden de forma favorable al tratamiento; no obstante, se describe un número importante de fallos terapéuticos que conllevan al desenlace fatal (Córdoba et al., 2016; Tsuji et al., 2005). En esencia, los agentes antifúngicos de elección en el manejo de la meningitis criptocócica incluyen a la anfotericina B intravenosa (desoxicolato o sus formulaciones lipídicas), la flucitosina y el fluconazol (Manosuthi et al., 2006; Perfect et al., 2010).

El esquema más efectivo hasta el momento consiste en tres fases. Durante la primera (inducción) se administra de forma simultánea 0,7 - 1 mg/kg de anfotericina B desoxicolato por vía intravenosa y 100 mg/kg/día de flucitosina por vía oral dividido en cuatro tomas durante dos semanas. En la segunda fase (consolidación) el tratamiento de elección es el fluconazol (400 mg/día) durante ocho semanas. Para la tercera y última fase del tratamiento (mantenimiento) se recomienda el fluconazol (200 mg/día) de 12 a 18 meses después de lograr recuentos de CD_4^+ superiores a 200 células/ μ L y la supresión exitosa de la replicación viral del VIH para evitar las recaídas (Day, Chau, y Lalloo, 2013; Perfect et al., 2010; WHO, 2011). Durante todo el curso del tratamiento se recomienda seguir al paciente con controles clínicos y antigenemia (Perfect et al., 2010).

Los pacientes suelen tener reacciones secundarias a la anfotericina B. Las mismas se caracterizan por mialgias, insuficiencia renal e hipocalcemia severa que no mejora con suplementos de potasio parenteral y solo desaparecen al suspender el medicamento. Estos casos pudieran ser tratados de forma alternativa con formulaciones lipídicas de este medicamento, fluconazol o itraconazol (400 mg/d) asociado con la flucitosina durante seis semanas (López, 2002; Tsuji et al., 2005).

A pesar de lo anterior, las cifras alarmantes de fallos terapéuticos y recaídas indican la carencia de un régimen óptimo para el control de esta infección. Esto hace necesario la evaluación de nuevas estrategias e impulsa el desarrollo de nuevos agentes tales como el ravuconazol, el albaconazol y el isavuconazol los cuales se encuentran actualmente

en diferentes estadios de desarrollo (Fera, La Camera, y De Sarro, 2009; Guinea y Bouza, 2008).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio y marco de la investigación

Se condujo un estudio observacional, de corte transversal, desde diciembre de 2013 a enero de 2015.

En el mismo estuvieron involucrados el Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña”, sitio de atención a los pacientes adultos (≥ 18 años) seropositivos al VIH y el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas “Dr. Enrique Ortega Moreira”, de la Universidad Espíritu Santo (UEES), donde se realizaron todos los estudios microbiológicos, ambos en Guayaquil, Ecuador. La investigación se desarrolló bajo la conducción del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” de La Habana, Cuba.

Desde el punto de vista organizacional contó con tres partes fundamentales: 1) el estudio de los principales aspectos clínicos y epidemiológicos de los pacientes seropositivos al VIH ingresados con sospecha de neuroinfección en la Ciudad de Guayaquil; 2) el diagnóstico microbiológico de criptococosis y la caracterización de los aislados recuperados y 3) la investigación de posibles fuentes de infección por *C. neoformans*/*C. gattii* en árboles aledaños al hospital. En el anexo 1 se muestra el diagrama general de trabajo.

El presente trabajo se encuentra enmarcado en el programa de Doctorado en Ciencias Médicas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” de La Habana, Cuba, está sustentado por las autoridades competentes de este país y el Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la UEES, Guayaquil, Ecuador.

3.2. Universo y muestra

El universo de los pacientes para el estudio de los aspectos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos comprendió a todos los individuos seropositivos al VIH que ingresaron en el Hospital de Infectología de Guayaquil entre diciembre de 2013 y enero de 2015. La muestra se acotó según los criterios de inclusión y exclusión (ver 3.2.1).

Para el estudio ambiental, el universo comprendió todos los árboles adultos encontrados en un perímetro de hasta medio kilómetro, 360° a los alrededores del Hospital. La muestra abarcó aquellos que cumplieron los criterios de selección (ver 3.2.2).

3.2.1. Criterios de selección de los pacientes

3.2.1.1. Criterios de inclusión

- Pacientes seropositivos al VIH, que ingresaron en el Hospital de Infectología de Guayaquil entre diciembre de 2013 y enero de 2015.
- Fiebre (temperatura > 38 °C).
- Presentar síntomas de neuroinfección.
- Aceptar su participación en el estudio a través de la firma de un consentimiento informado (anexo 2).

3.2.1.2. Criterios de exclusión (anexo 3)

- Pacientes que recibieron tratamiento antimicótico hasta 30 días previos a la toma de la muestra.
- Muestra insuficiente (< 3 mL) o de mala calidad (hemática, derramada, frascos inapropiados o mal identificados, etc).

3.2.1.3. Criterios de salida del estudio

- A solicitud del paciente.

3.2.2. Criterios de selección de los árboles para la toma de muestra ambiental

- Ejemplares adultos de cualquier especie con cavidades o ranuras evidentes ubicadas a una altura mayor o igual a 1 m con relación al suelo.

3.3. Procedimientos de trabajo

En el anexo 4 se ilustra el diagrama general que se empleó en el presente trabajo para el aislamiento, identificación y caracterización de *C. neoformans/C. gattii*.

3.3.1. Procedimiento para la recolección de datos, toma muestra de LCR y su procesamiento.

Los datos de los pacientes se recolectaron a partir de las historias clínicas realizadas por los médicos de asistencia del Hospital, así como por las entrevistas efectuadas a los mismos por la autora del trabajo. Las variables de estudio se encuentran descritas en la ficha de colecta de datos, e incluyen signos y síntomas, así como parámetros de laboratorio.

Las muestras de LCR se obtuvieron mediante punción lumbar por el facultativo de cada paciente de acuerdo con los procedimientos establecidos en el Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña”. Una parte de la muestra se consignó a los laboratorios de la UEES para el estudio micológico correspondiente al presente trabajo de tesis; otra parte se trasladó al laboratorio de microbiología del hospital donde se desarrolló el procedimiento establecido para dar respuesta al seguimiento de los pacientes. Esto garantizó la realización de los estudios y la entrega de los resultados respectivos en el caso que el paciente hubiese consentido en su participación y la muestra no cumpliera los criterios de inclusión.

Los LCR se centrifugaron por 15 minutos a 2 500 x g. Se tomaron 10 µL del sedimento para realizar un examen directo con tinta china para la detección de levaduras capsuladas y 20 µL para cultivo en ADS a partir del cual se realizó la identificación y caracterización de los agentes recuperados como se describe en acápite 3.4.3 (Gray y Fedorko, 1992).

3.3.2. Procedimiento para la toma de muestra de origen ambiental y su procesamiento

Para este estudio se recolectaron muestras de árboles adultos ubicados en las áreas aledañas al hospital. La recolección se realizó desde octubre de 2014 hasta diciembre de

ese mismo año. De cada uno se tomaron de 1 - 3 muestras, en dependencia del número de cavidades o ranuras expuestas.

Las muestras consistieron en hisopados de cavidades o ranuras detectadas en los troncos. Para este proceder se utilizaron hisopos de algodón estériles humedecidos, previamente, en solución salina estéril (SSE) con gentamicina (25 mg/L). Una vez tomada la muestra, los hisopos se introdujeron de forma individual en tubos de ensayo con tapa de rosca con 2 mL de SSE + 25 mg/L de gentamicina. Las muestras se transportaron al laboratorio de la UEES y se procesaron en un tiempo no mayor de 24 h (Randhawa et al., 2005).

Cada muestra se sembró por duplicado en placas de Petri con medio AAC (Vidotto et al., 2004); las placas se mantuvieron en la oscuridad a 35 °C hasta los 10 días. Durante ese tiempo se realizó un examen estereoscópico diario en busca de colonias que tuvieran características morfológicas compatibles con las producidas por las levaduras del género *Cryptococcus* (redondas, de superficie lisa, húmedas con aspecto cremoso y consistencia mucoide o no, bordes regulares y color del beige a carmelita intenso).

Como controles se emplearon las cepas de referencia *C. neoformans* ATCC® 208821 y *Candida albicans* ATCC® 10231 donadas por el Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI) de Guayaquil, Ecuador.

3.3.3. Identificación y caracterización fenotípica de los aislados levaduriformes recuperados de las muestras de LCR y material vegetal

La identificación presuntiva se realizó de acuerdo con las características macro- y micro- morfológicas, la capacidad de crecer a 37 °C, la detección de la actividad ureasa y fenoloxidasa (Koneman y Allen, 2008; Pemán, Martín-Mazuelos, y Calvo, 2001; Pemán, Martín Mazuelos, y Rubio Calvo, 2007) la asimilación de los azúcares de la galería comercial API® 20C AUX (bioMérieux SA, 2007), según las instrucciones del fabricante y el crecimiento en el medio CGB. (Kwon-Chung et al., 1982). Los aislados que arrojaron códigos aberrantes al aplicar el sistema comercial API® 20C AUX (bioMérieux SA, 2007) se sometieron a la identificación de género y especie mediante MALDI-TOF según las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones

descritas por Firacative y cols (Firacative, Trilles, y Meyer, 2012). Este procedimiento se desarrolló a partir de aislados puros después de 24 horas de crecimiento en el medio ADS.

Los materiales y medios de cultivo se prepararon según Guevara, Urcia, y Casquero, 2007. Como controles de calidad tanto de los medios de cultivo como de los procedimientos que se realizaron, se emplearon las cepas de referencia *C. neoformans* ATCC® 208821 y *Candida albicans* ATCC® 10231 donadas por el Laboratorio de Micología del INSPI.

3.3.4. Caracterización molecular de los aislados previamente identificados como *C. neoformans*/*C. gattii*.

Extracción de ADN: de cada uno de los aislados identificados por los métodos fenotípicos como *Cryptococcus* se tomaron 10 colonias (< 48 horas) los cuales se suspendieron de forma independiente en 200 µL de tampón fosfato. Para extraer el ADN total se empleó el estuche comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit*® (Roche, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Se adicionó un paso previo de lisis celular con liticasa (Sigma-Aldrich, EUA) (10 µL por muestra a 0,5 mg/mL) e incubación a 37 °C durante 30 minutos.

Determinación del serotipo y tipo de apareamiento: la determinación se realizó a través de dos PCR según Carvalho et al., 2007. Para las mismas se emplearon los juegos de cebadores que se listan en la tabla 2.

Tabla 2. Combinación de cebadores empleados en la determinación del serotipo y tipo de apareamiento de los aislados presuntivamente identificado por métodos convencionales como *Cryptococcus*.

	Alelo o domino	Cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')	Talla (pb)
Reacción I	<i>MAT</i> α serotipo A	<i>JOHE 7264</i>	5'-AGCTGATGCTGTGGATTGAATAC-3'	1 200
		<i>JOHE 7265</i>	5'-GTTCAATTAATCTCACTACCTGTAG-3'	
	<i>MAT</i> α serotipo A	<i>JOHE 7270</i>	5'-ATCAGAGACAGAGGAGGAGCAAGAC-3'	870
		<i>JOHE 7272</i>	5'-TCCACTGGCAACCCTGCGAG-3'	
Reacción II	<i>MAT</i> α serotipo D	<i>JOHE 7267</i>	5'-ATAGGCTGGTGTGTGAATTAAG-3'	1 200
		<i>JOHE 7268</i>	5'-GTTCAAGTAATCTCACTACATGCG-3'	

Adaptado de (Carvalho et al., 2007)

Por cada reacción se emplearon 0,2 µM de cebadores; 0,02 U/µL de *Taq* polimerasa; 1,5 mM de MgCl y 0,2 mM de dNTP's. La primera reacción se sometió a 94 °C por 1 minuto, seguido de 59 °C durante 30 segundos, luego 30 ciclos a 72 °C por 1 minuto y finalizó con 72 °C por 10 minutos. La segunda reacción consistió en 94 °C por 1 minuto, 61 °C por 30 segundos, 30 ciclos a 72 °C por 1 minuto y culminó con 72 °C por 10 minutos. Todos los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2 % a 100 V durante 1 hora (Carvalho et al., 2007).

Determinación de las variedades moleculares: se aplicó la técnica de RFLP, siguiendo el protocolo desarrollado por Meyer y cols., en 2003 (Meyer et al., 2003). Se utilizaron los cebadores *URA5* (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG3') y *SJ01* (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC3').

El producto de la reacción se digirió con las enzimas de restricción *HhaI* y *Sau96I*; los fragmentos obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 3 % después de aplicarle 80 V durante 3,5 horas.

Como controles se emplearon cepas de referencia de *Cryptococcus* CBS9172 (Aα, VNI), CBS8710 (Aα, VNI), CBS10511 (Da, VNIV), CBS10513 (Dα, VNIV), CBS6956 (Bα, VGII); CBS10101 (Cα, VGIV); *Candida albicans* ATCC® 10231 y agua. Todas las cepas de referencia fueron gentilmente donadas por el Laboratorio de Micología del INSPI de Guayaquil, Ecuador.

3.3.5. Determinación de los patrones de susceptibilidad

Todos los aislados recuperados pertenecientes al complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* se sometieron a las pruebas de susceptibilidad antifúngica, mediante el método de difusión en medio sólido E-Test para levaduras, según las recomendaciones del proveedor (AB Biodisk, Suecia). Se hace una exposición breve de la realización de esta determinación:

Medio de cultivo: se empleó el medio sintético RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, EUA) solidificado con 2 % de agar según la metodología del documento M27-A3 (CLSI, 2012). Las placas se conservaron a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Antifúngicos: se emplearon tiras de E-test impregnadas con anfotericina B (0,02-32 µg/mL), flucitosina (0,02-32 µg/mL) y fluconazol (0,016-256 µg/mL) (AB Biodisk, Suecia).

Inóculo: las suspensiones de trabajo se prepararon a partir de cultivos en ADS a 35 °C incubados durante 48 horas. Se preparó una suspensión en SSE y se ajustó la concentración a $1-5 \times 10^6$ células/mL mediante conteo en cámara de Neubauer.

Preparación e inoculación de las placas: antes de su utilización las placas se hicieron reposar fuera del refrigerador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Con un hisopo de algodón estéril embebido en el inóculo se sembró la superficie del agar en tres direcciones (tres placas por cada aislado objeto de estudio). Después de 10-15 minutos se colocaron las tiras de E-test con ayuda de una pinza estéril (una tira por placa).

Incubación y lectura: las placas se colocaron en cámara húmeda a 35 °C durante 48-72 horas. Se estimó como CIM el valor donde el borde de la elipse de inhibición interceptó 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 VCE para el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, según Espinel-Ingroff expresado en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de corte epidemiológico para el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii* frente a anfotericina B, flucitosina y fluconazol.

Antifúngico	Valor de corte epidemiológico µg/mL		
	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans/C. gattii</i>
Anfotericina B	0,5-1	0,5-1	0,5-1
Flucitosina	8-16	4-16	4-16
Fluconazol	4	4-8	4-8

Adaptado de (Espinel-Ingroff, Aller, et al., 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, et al., 2012)

Controles: la calidad de cada lote de medio de cultivo y de todo el procedimiento se evaluó mediante la ejecución de la técnica con las cepas de referencia *Candida krusei*

ATCC[®] 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019 donadas por el INSPI. A este proceso se adicionó la determinación de la esterilidad del lote mediante incubación de dos a tres placas a 35 °C durante 48 horas (CLSI, 2012).

Los aislados con una CIM por encima de los valores de corte se revaluaron mediante el sistema comercial *Sensititre Yeast One*[®] (*Thermo Scientific*, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4. Análisis estadístico

Los datos se ingresaron en una base de datos de Microsoft Excel y se analizaron mediante los programas informáticos EpiInfo versión 7 del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de EUA y SPSS 19 de IBM (*International Business Machines*, EUA).

Para dar respuesta a los dos primeros objetivos se emplearon frecuencias y porcentajes. Además se analizó la asociación estadística entre la presencia de la infección y los hallazgos clínicos en los pacientes. Se obtuvo la prevalencia de la infección en la muestra objeto de estudio, la razón de prevalencias entre las variables (los valores ≥ 1 se tomaron como referencia de asociación entre los factores estudiados y la presencia de criptococosis) y el Chi cuadrado de Mantel-Haenszel, para determinar la asociación estadística entre la variable (clínica/laboratorio) y la presencia de infección por *Cryptococcus*.

En relación con los estudios de sensibilidad *in vitro* de los aislados del complejo *C. neoformans/C. gattii* frente a los antifúngicos empleados en la primera línea de tratamiento de la infección criptocócica se estimaron los rangos según los valores de CIM máximos y mínimos, el promedio, la media geométrica, así como la CIM 50 y 90.

3.5. Aspectos éticos y legales

El protocolo de este trabajo de tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Médicas se aprobó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética, ambos del IPK, así como por Comité de Bioética COBI-ASFORUM, certificado por las autoridades locales de salud de Ecuador (anexos 4, 5 y 6).

Procedimientos para garantizar aspectos éticos en las investigaciones con sujetos humanos: Para la selección de los pacientes se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión establecidos para este estudio.

Los procedimientos estuvieron a cargo del médico de cabecera en cada caso quien brindó a los individuos seleccionados la posibilidad de preguntar cualquier detalle del estudio antes de firmar las planillas de consentimiento informado y acceder a la entrevista para la recolección de datos y la posterior toma de muestra.

En la confección de la base de datos se usaron códigos numéricos para mantener la privacidad de los resultados. Solo la responsable del estudio tuvo acceso a la misma y manejó la información con estricta confidencialidad.

Se tuvieron en cuenta los principios básicos de la bioética establecidos en la Declaración de Helsinki (2008) (beneficencia, no maleficencia, respeto a la persona y justicia). A todos los individuos se les explicó que su participación en la investigación era absolutamente voluntaria y que la decisión de abandonar el estudio no traería consigo cambio alguno en la conducta del médico de asistencia.

Procedimientos para garantizar aspectos éticos de la investigación relacionada con las muestras ambientales: La recolección de las muestras vegetales se realizó por personal experimentado en los procedimientos relacionados. Se garantizó la conservación y protección de la flora y se evitaron daños o perjuicios al medio ambiente de acuerdo con lo establecido en el artículo 17 de la Declaración Universal de las Normas de Bioética en su 4ta edición (ONU, 2005).

3.6. Aspectos de bioseguridad

El personal encargado del procesamiento de las muestras se capacitó e instruyó en las operaciones relacionadas con este trabajo según lo dispuesto en el Manual de Bioseguridad del Laboratorio de Microbiología de la UEES, en relación con las buenas prácticas y el uso de equipos de protección personal.

Se cumplieron las buenas prácticas de laboratorio y todas las medidas de bioseguridad para el trabajo y la manipulación de los microorganismos de nivel II de riesgo, expuestas en el Manual de Bioseguridad de la OMS (Malkmus, 2006).

3.7. Principales limitaciones del estudio

Entre los principales aspectos detectados en el transcurso del trabajo y que pudieron dar lugar a sesgos en sus resultados se encuentran:

- La inclusión de la fiebre como criterio de inclusión de los pacientes, ya que inicialmente el trabajo se concibió para el estudio del síndrome febril en individuos seropositivos al VIH ingresados en el Hospital de Infectología de Guayaquil. No obstante, este propósito no fue factible debido a la decisión del hospital de obtener diagnóstico micológico a partir únicamente de pacientes con síndromes neurológicos, refiriendo únicamente LCR.
- La imposibilidad de poder completar los estudios de los niveles de células CD₄⁺ y carga viral debido a la insuficiencia de recursos en el hospital para el desarrollo de estos exámenes durante el período que comprendió el estudio.
- La no disponibilidad del método de referencia para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antifúngicos frente a los aislados recuperados.

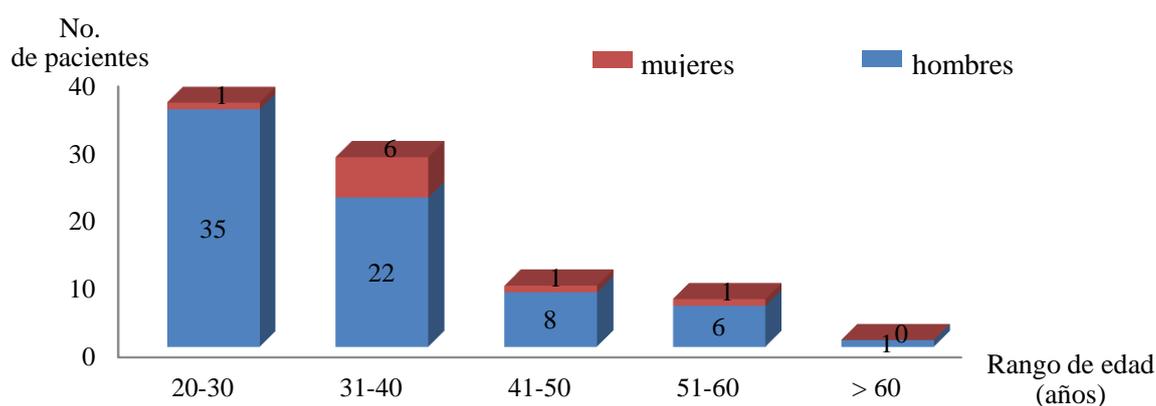
4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Datos generales de los pacientes objeto de estudio

Durante el período de estudio acudieron 2 162 individuos con VIH-sida al Hospital “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña”. El universo quedó constituido por 232 pacientes hospitalizados, de los cuales 110 presentaron sospecha clínica de síndrome neurológico infeccioso. De estos, 15 recibieron tratamiento antimicótico 30 días previos al ingreso, nueve no consintieron en participar en la investigación, la muestra fue insuficiente en cuatro y en otro no fue posible completar la ficha de datos. Después de estas exclusiones la muestra del estudio quedó conformada por 81 pacientes (anexo 7).

La mayor proporción de pacientes que conformó la muestra del estudio correspondió al género masculino en edad laboralmente activa (figura 1, tabla 4).



Fuente de los datos: Historia clínica de los pacientes

Figura 1. Distribución por género y edad de los pacientes con VIH y síndrome neurológico infeccioso ingresados en el Hospital “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña” entre diciembre 2013-enero 2015 y que conformaron la muestra del estudio (n = 81).

Tabla 4. Análisis de la frecuencia y porcentaje de la distribución según los rangos de edades de los pacientes con VIH y síndrome neurológico que conformaron la muestra del estudio (n = 81).

Rango de edades de los pacientes	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
20-29	28	34,6	34,6
30-39	30	37,0	71,6
40-49	15	18,5	90,1
50-59	6	7,4	97,5
≥60	2	2,5	100,0
Total	81	100,0	

Fuente de los datos: historia clínica de los pacientes

Datos clínicos de los pacientes objeto de estudio al momento del ingreso

La fiebre fue un criterio de inclusión para el estudio, por lo que no constó en el listado de las variables. Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes estuvieron la pérdida de peso, la cefalea y los vómitos. Más de la mitad de los pacientes poseían una escala de Glasgow de 13-15, es decir se encontraban bien orientados, más del 60 % no estaba bajo un régimen de TARVAE y el 44 % presentaban un mes o más de evolución de sus manifestaciones neurológicas (tabla 5).

En relación con los parámetros de laboratorio, la determinación de los linfocitos TCD₄⁺ estuvo disponible para 22 de los 81 pacientes. En estos casos, predominaron los valores ≤ 200 células/μL (15/22). El número de leucocitos no mostró ninguna tendencia en relación con los grupos establecidos. Sin embargo, la mayoría de los participantes tenían valores de hematócrito y de hemoglobina por debajo de 35 % y 11 g/dL, respectivamente (tabla 6).

Tabla 5. Frecuencia y porcentaje en que se presentaron las manifestaciones clínicas de los pacientes con VIH y síndrome neurológico que conformaron la muestra del estudio (n = 81).

Variable	Frecuencia	Porcentaje (%)
Síntomas clínicos		
Cefalea	66	81
Vómitos	54	67
Pérdida de peso	71	88
Adenopatías	24	30
Cambios conductuales	23	28
Trastornos visuales	36	44
Signos meníngeos	14	17
Convulsiones	22	27
Déficit motor	26	32
Total	81	100
Escala de Glasgow		
13-15	56	69
09-12	16	20
≤8	9	11
Total	81	100
Esquema TARVAE		
Esquema: Viraday*	18	22
Esquema: Efavirenz**	13	16
Total	31	100
Días de evolución		
<1 semana	17	21
1-4 semanas	28	35
> 1 mes	36	44
Total	81	100

Fuente de los datos: historia clínica de los pacientes

*Viraday: compuesto genérico de Atripla, que contiene efavirenz, emtricitabina y tenofovir (Vance et al., 2016)

**Efavirenz: inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de los nucleósidos

Tabla 6. Frecuencia y porcentaje en que se presentaron los valores de los parámetros de laboratorio de los pacientes con VIH y síndrome neurológico que conformaron la muestra del estudio (n = 81).

Variables	Frecuencia	Porcentaje (%)
Niveles de células CD4 (células/μL)		
No reportado	59	72,84
< 200	15	18,52
201-499	6	7,41
>500	1	1,23
Total	81	100
Leucocitos (células/ mm³)		
< 5 000	37	45,68
5 000-10 000	38	46,91
> 10 000	6	7,41
Total	81	100
Hemoglobina (g/dL)		
<11	45	55,56
11-15	33	40,74
>15	3	3,70
Total	81	100
Hematócrito (%)		
< 35	67	82,72
36-42	10	12,35
> 42	4	4,94
Total	81	100
Valores normales de referencia: Niveles de células CD4: >500 células/ μ L Leucocitos: > 5000 células/ mm ³ Hemoglobina: \geq 12 g/dL Hematocrito: \geq 35 %		

Fuente de los datos: historia clínica de los pacientes.

4.2. Prevalencia de criptococosis en síndrome neurológico infeccioso de los pacientes con VIH ingresados en el Hospital “Dr. José D. Rodríguez Maridueña” entre diciembre 2013 y enero 2015

El examen directo con tinta china del LCR de los pacientes seropositivos al VIH ingresados con síndrome neurológico en el Hospital de Infectología durante el período de estudio detectó la presencia de células levaduriformes en 32 muestras para una frecuencia de 39,51 %. No obstante, sólo en 27 de ellas se logró la recuperación del

agente mediante el cultivo, determinando una prevalencia de 33,33 % de criptococosis en pacientes con síndrome neurológico y VIH.

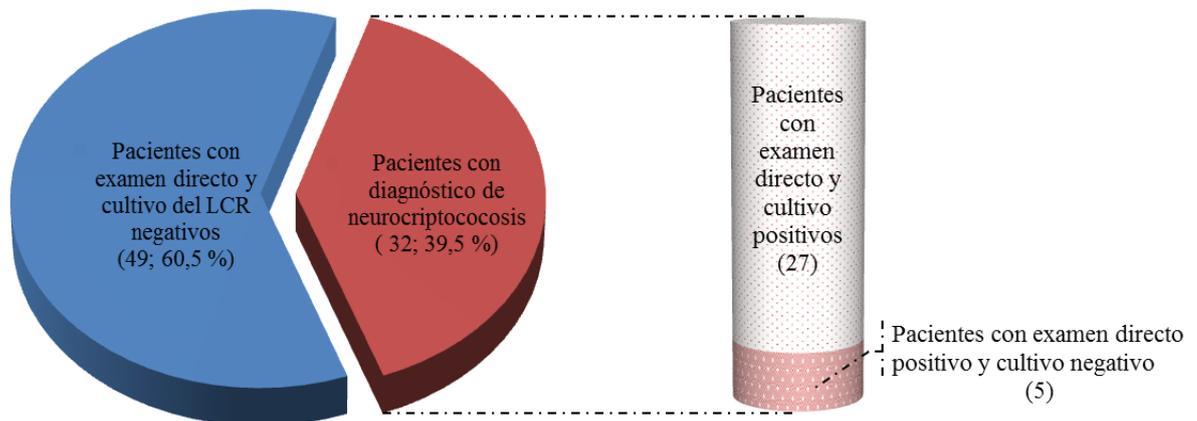


Figura 2. Proporción de pacientes incluidos en el estudio con sospecha clínica de síndrome neurológico infeccioso y con diagnóstico de neurocriptococosis mediante examen directo y cultivo micológico.

Todos los aislados hidrolizaron la urea y únicamente produjeron blastoconidias en agar harina de maíz con Tween 80. La identificación mediante el método comercial API® 20C AUX (bioMérieux SA, 2007) y el crecimiento en el medio CGB mostró el predominio de la especie *C. neoformans*, pues 21 aislados de los 27 mostraron códigos compatibles con esta identificación. Los resultados de los seis aislados restantes resultaron incongruentes; no obstante, la reidentificación de los mismos mediante espectrometría de masa permitió confirmar que estos correspondían a la misma especie antes mencionada.

El 100 % de los aislados correspondieron a individuos del género masculino de los cuales el 70 % contaban entre 20 y 30 años de edad.

4.3. Datos clínicos de los pacientes del estudio con neurocriptococosis

En este punto es prudente reiterar que la fiebre se consideró como criterio de inclusión en el presente estudio, por lo que no consta entre las variables analizadas en este aparte. Por su parte, la pérdida de peso, los vómitos y la cefalea, en orden decreciente, fueron

las manifestaciones predominantes, en tanto el déficit motor y los signos meníngeos fueron los menos frecuentes. En relación con los días de evolución no se demostró predominio significativo (tabla 7).

Tabla 7. Análisis estadístico de las variables clínicas estudiadas en los 27 pacientes con neurocriptococosis que ingresaron en el Hospital “Dr. José D. Rodríguez Maridueña” entre diciembre 2013 y enero 2015.

Variables clínicas	Ausencia n (%)	Presencia n (%)	Análisis estadístico			
			Chi-cuadrado	2-colas p	RP	
Cambios conductuales	22 (81,5)	5 (18,5)	Sin corrección	1,943	0,163	0,56
			Mantel-Haenszel	1,919	0,166	
			Con corrección (Yates)	1,2827	0,257	
Vómitos	4 (14,8)	23 (85,2)	Sin corrección	6,25	0,012	1,48
			Mantel-Haenszel	6,1728	0,013	
			Con corrección (Yates)	5,0625	0,024	
Trastornos visuales	17 (63)	10 (37)	Sin corrección	0,9	0,343	0,77
			Mantel-Haenszel	0,8889	0,346	
			Con corrección (Yates)	0,5063	0,477	
Cefalea	6 (22,2)	21 (77,8)	Sin corrección	0,3682	0,544	0,93
			Mantel-Haenszel	0,3636	0,546	
			Con corrección (Yates)	0,092	0,762	
Signos meníngeos	23 (85,2)	4 (14,8)	Sin corrección	0,1727	0,678	0,80
			Mantel-Haenszel	0,1706	0,68	
			Con corrección (Yates)	0,0108	0,917	
Convulsiones	22 (81,5)	5 (18,5)	Sin corrección	1,529	0,216	0,59
			Mantel-Haenszel	1,51	0,219	
			Con corrección (Yates)	0,944	0,331	
Pérdida de peso	3 (11,1)	24 (88,9)	Sin corrección	0,057	0,811	1,02
			Mantel-Haenszel	0,056	0,812	
			Con corrección (Yates)	0	1	
Adenopatías	18 (66,7)	9 (33,3)	Sin corrección	0,2664	0,606	1,20
			Mantel-Haenszel	0,2632	0,608	
			Con corrección (Yates)	0,0666	0,796	
Déficit motor	23 (85,2)	4 (14,8)	Sin corrección	5,551	0,018	0,36
			Mantel-Haenszel	5,483	0,019	
			Con corrección (Yates)	4,425	0,035	
< 1 semana de evolución	7 (26%)	20 (74%)	Sin corrección	0,5956	0,4403	0,93
			Mantel-Haenszel	0,5882	0,4431	
			Con corrección (Yates)	0,2327	0,6296	
1 - 4 semanas de evolución	10 (37%)	17 (63%)	Sin corrección	0,1092	0,741	1,33
			Mantel-Haenszel	0,1078	0,7426	
			Con corrección (Yates)	0,0068	0,9342	

> 5 semanas de evolución	10 (37%)	17 (63%)	Sin corrección	0,9	0,3428	1,33
			Mantel-Haenszel	0,8889	0,3458	
			Con corrección (Yates)	0,5063	0,4768	

RP: Razón de prevalencia

Fuente de los datos: historia clínica de los pacientes y encuestas.

Respecto a los parámetros hematológicos, no se contó con los resultados de conteo de células TCD₄⁺ en 19 de los 27 pacientes con criptococosis; no obstante, en los disponibles se obtuvieron valores de linfocitos TCD₄⁺ < 200 células/μL. Los parámetros restantes evidenciaron que más de la mitad de los pacientes presentaban alteración en la serie eritrocítica (hematocrito y hemoglobina) (tabla 8).

Tabla 8. Análisis estadístico de las variables hematológicas estudiadas en los 27 pacientes con neurocriptococosis ingresados en el Hospital “Dr. José D. Rodríguez Maridueña” entre diciembre de 2013 y enero de 2015.

Variables hematológicas	n (%)	Análisis estadístico
Leucocitos (células/mm ³)		
< 5 000	6 (22,2)	Chi cuadrado 10 102 df 2 Probabilidad 0,006
5 000 – 10 000	17 (62,96)	
> 10 000	4 (14,81)	
Hemoglobina (g/dL)		
< 11	14 (51,85)	Chi cuadrado 0,236 df 2 Probabilidad 0,888
11 - 15	12 (44,44)	
> 15	1 (3,70)	
Hematocrito (%)		
< 35	19 (70,37)	Chi cuadrado 1,285 df 2 Probabilidad 0,525
35 - 40	4 (14,81)	
> 40	4 (14,81)	
Niveles de células CD4 (células/μL)		
No reportado	19 (70%)	Chi cuadrado: 0,000 Probabilidad: 0,000
< 200	7 (26%)	Chi cuadrado: 1,4727 Probabilidad: 0,2249
201-499	1 (4%)	Chi cuadrado: 0,81 Probabilidad: 0,3681
>500	-	Chi cuadrado: 0,000 Probabilidad: 0,000

Fuente de los datos: historia clínica de los pacientes

Al hacer el análisis estadístico de asociación para determinar las características clínicas y hematológicas relacionadas con la presencia de la infección criptocócica, se obtuvo asociación significativa entre la presencia de vómitos, déficit motor y valores normales de leucocitos (valores de $p < 0,05$).

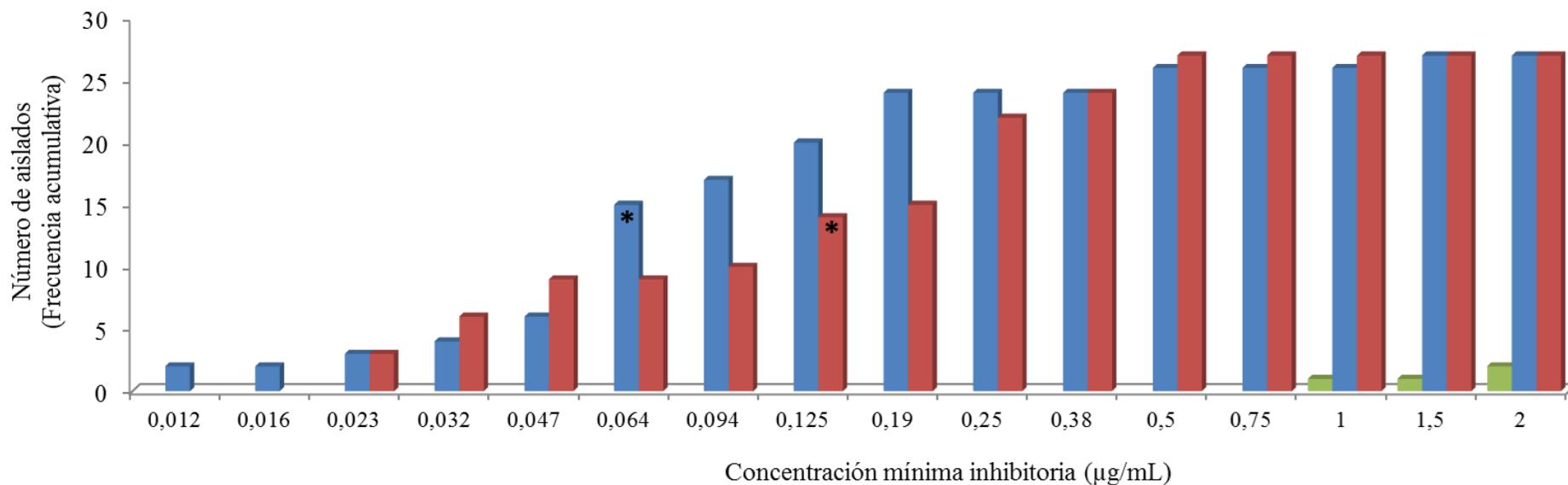
4.4. Patrones de susceptibilidad de los aislados de *C. neoformans* recuperados frente a los antifúngicos de primera línea del tratamiento

Todos los aislados identificados fueron sensibles a la flucitosina y a la anfotericina B, en tanto que la mayor parte de los mismos (25/27) no se inhibieron con el fluconazol a concentraciones por debajo de 4 $\mu\text{g/mL}$. Estos últimos aislados fueron reevaluados mediante el sistema comercial *Sensititre Yeast One* (*Thermo Scientific*, USA) a través del cual se confirmaron los resultados previos. En la figura 3 se presenta la frecuencia acumulada de la CIM, sus valores mínimos y máximos, los promedios, la media geométrica, así como la CIM₅₀ y CIM₉₀ para cada antifúngico.

4.5. Serotipo y tipo de apareamiento de los aislados de *Cryptococcus* recuperados de las muestras clínicas

La caracterización molecular de los 27 aislados recuperados de LCR demostró que 24 de ellos pertenecieron al serotipo A, al tipo de apareamiento *MAT α* y al genotipo VNI. En los tres restantes aislados no se logró la amplificación del fragmento *URA5*, lo que imposibilitó la determinación de esas características.

En la figura 4 se muestra la imagen de una corrida electroforética en la que se visualiza la amplificación de fragmentos de 1 200 pb correspondientes con *MAT α* .



Parámetros	Fluconazol	Flucitosina	Anfotericina B
Valor máximo	2,000	1,500	0,500
Valor mínimo	-	0,012	0,023
Promedio	0,111	0,169	0,189
Media geométrica	1,414	0,088	0,122
CIM 50*	-	0,064	0,125
CIM 90	-	0,190	0,380

Figura 3. Distribución de los valores acumulativos de CIM para el fluconazol, la flucitosina y la anfotericina B frente a los 27 aislados de *Cryptococcus* recuperados del LCR de los pacientes incluidos en el estudio. Los valores de CIM₅₀ se destacan con un asterisco en la barra correspondiente a cada antifúngico.



Figura 4. Corrida electroforética a 100 V durante una hora en gel de agarosa al 2 % de los fragmentos amplificados mediante PCR múltiple. Las columnas nombradas 47, 48, 52, 53 y 55 corresponden a las muestras con estas identificaciones y muestran el amplicón de 1 200 pb correspondiente a *MATA α* . Los dos últimos pocillos corresponden al control negativo y al marcador de peso molecular según se indica en la figura. En el extremo inferior derecho también se declaran los cebadores empleados y la fecha de realización de la corrida.

4.6. Aislamiento de *Cryptococcus* en muestras ambientales

Para cumplimentar este objetivo se estudiaron 18 de los 60 árboles adultos ubicados en zonas aledañas al hospital que mostraron ranuras profundas u oquedades evidentes. Los mismos correspondieron a cuatro especies: *Ficus benjamina* (10), *Samanea saman* (4), *Senna siamea* (3) y *Pseudosamanea guachapele* (1) (figura 5).

Se colectaron un total de 40 muestras: 22 correspondieron a cavidades u oquedades y 18 a ranuras, en una distribución como se describe en la tabla 9. Al aplicar los métodos de aislamiento e identificación utilizados en el presente estudio no se obtuvieron colonias de aspecto levaduriforme compatibles con las características macroscópicas de *C. neoformans*/*C. gattii* en las muestras obtenidas.

Tabla 9. Distribución de muestras ambientales en relación a especie estudiada.

Especies	Cantidad de cavidades	Cantidad de ranuras
<i>Ficus benjamina</i>	13	15
<i>Samanea saman</i>	4	8
<i>Senna siamea</i>	3	5
<i>Pseudosamanea guachapele</i>	2	0



Ficus benamina



Samanea saman



Senna siamea



Pseudosamanea guachapele

Figura 5. Imágenes de las principales especies de árboles presentes en los alrededores del Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador y que fueron muestreados en el marco del estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptocosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

C. neoformans es un hongo oportunista que afecta con frecuencia a los individuos infectados por el VIH tipo 1 (VIH-1) (Cogliati, 2013; Mazuelos y Garcia, 2010). La utilización masiva de la TARVAE reduce la frecuencia de esta micosis sistémica, al tiempo que provoca cambios significativos en las manifestaciones clínicas y en los resultados de las pruebas de diagnóstico de laboratorio (Mazuelos y Garcia, 2010). Los trabajos consultados, muestran porcentajes variables que oscilan desde 2 % en Europa Occidental y Estados Unidos (Hasimoto e Souza et al., 2013) hasta 91% en Sudáfrica (Mwaba et al., 2001). Al estimar el comportamiento de esta neuroinfección en el mundo en pacientes con VIH, Park y cols., en 2009 establecen una proyección de 957 900 casos al año, con una prevalencia mundial de 0,04 a 12 % (Park et al., 2009).

Los antecedentes de estudios relacionados con la criptococosis en Ecuador son escasos y los existentes se limitan a la descripción parcial del problema. En el propio hospital de Infectología donde se desarrolló la presente investigación existen dos trabajos previos. El primero fue publicado y se basa en la utilidad del examen directo de muestras de orina con tinta china; los datos aportados se obtienen a partir de la revisión de las historias clínicas de los pacientes y tiene en cuenta su diagnóstico al egreso (Chiang et al., 2011). Entre sus principales limitantes se encuentran 1) el empleo de la orina como muestra, ya que la ideal para el diagnóstico de neurocriptococosis es el LCR, 2) el diagnóstico basado solo en el examen directo, el cual puede ofrecer resultados tanto falsos positivos como negativos y 3) no contempla aspectos relevantes tales como el aislamiento e identificación de *Cryptococcus*, la susceptibilidad del agente a los antifúngicos y el cuadro clínico asociado, entre otros. El segundo es una tesis de pregrado la cual se propone la descripción de algunas de las comorbilidades infecciosas en los pacientes con sida, incluyendo la criptococosis, pero sus datos son incongruentes e inexactos y solo está disponible en la biblioteca de la facultad de medicina (Tircio y Vallejo, 2014).

También existen publicaciones aisladas sobre casos de criptococosis en pacientes con VIH o no; sin embargo, estos se limitan a la descripción clínica de cada evento particular (Jarrín et al., 2012; Khawcharoenporn, Apisarnthanarak, Kiratisin, Mundy, y Bailey, 2006; Paúl y Cardona, 2008; Paz, 2014).

La falta de estudios sobre la criptococosis y su agente causal en Ecuador realizados de forma sistemática y que se encuentren disponibles, hace que los conocimientos sobre la temática sean pocos e imprecisos. De hecho, en los mapas publicados que reflejan los análisis globales, este país es uno de los pocos de América para el que no se ubica dato alguno (Cogliati, 2013; Meyer et al., 2003).

El presente trabajo pretende dar respuesta a algunas de las interrogantes existentes en torno a esta entidad en Guayaquil, Ecuador.

5.1. Caracterización demográfica del universo de estudio.

La caracterización demográfica de los participantes del estudio, demostró concordancia con investigaciones previas que demuestran que la mayor parte de los individuos corresponden al género masculino y al grupo etario entre 20-40 años. Esto reafirma las evidencias anteriores sobre el riesgo de exposición en este grupo poblacional (Armstrong-James et al., 2014; Lizarazo et al., 2007). En el Ecuador el género masculino y el grupo etario entre los 20-40 años es el más afectado por el VIH-sida (MSP, 2011); además está bien documentada la exposición social y laboral de este grupo (población económicamente activa) a la infección por el virus (INEC, 2012).

5.2. Prevalencia de neurocriptococosis en pacientes seropositivos al VIH y sus principales características demográficas.

Estimar la carga nacional, regional o mundial de la neurocriptococosis es crucial para la guía de las intervenciones estratégicas e identificar las necesidades de los recursos para el diagnóstico y el manejo adecuado de los pacientes.

En 2008 se publicó el primer estimado de la incidencia mundial de criptococosis (cerca de un millón de casos anuales). Este se basó en las cohortes publicadas durante el período preTARVAE (Park et al., 2009). Con posterioridad, la introducción de esta terapia descontó un 39 % de la mortalidad en los pacientes con VIH. A partir de

entonces apareció un número creciente de publicaciones sobre la prevalencia de la antigenemia criptocócica y se demuestra la importancia de esta como precursor de la meningitis sintomática y la muerte por esta micosis. De forma adicional, se dieron a conocer estudios retrospectivos de Sudáfrica, Brasil, Ecuador, Nigeria, Tanzania, Kenia, Vietnam, Tailandia y EUA que describen la carga de la criptocosis en cada uno de estos países. Esto permitió actualizar el estimado global de la prevalencia entre los pacientes con VIH y conteos de linfocitos TCD₄⁺ < 100 células/μL en 6 %, el cual puede alcanzar hasta el 73 % en África Subsahariana (Rajasingham et al., 2017).

El presente estudio demostró una prevalencia superior a la descrita en la mayoría de los estudios realizados en la región. El resultado más cercano es el publicado por Bruno y cols. Éste exhibe una prevalencia de 35,71 % en 198 pacientes de Uruguay entre 2008-2011. Dicho trabajo corresponde a la revisión retrospectiva de fichas clínicas de pacientes con VIH, con el objetivo de conocer las complicaciones neurológicas más frecuentes en ese grupo de individuos. Los autores demuestran que los síntomas clínicos más frecuentes son los neurológicos como rigidez de nuca, cefalea intensa, hiperalgesia, fiebre, incoordinación de movimientos, entre otros (Bruno, Laborde, Broli, Pérez, y Dufrechou, 2013).

Los valores más altos son los informados por Lizarazo y cols., quienes describen que la neurocriptocosis es la coinfección más frecuente en los pacientes con VIH (prevalencia de 95,7 %). Su investigación incluye 891 casos de 76 centros hospitalarios en Colombia entre 1997 – 2005 (Lizarazo et al., 2007).

Autores de otras partes del mundo declaran cifras inferiores. En la India, Suryawanshi y cols., realizaron un estudio prospectivo donde determinan las causas fúngicas de la meningitis durante enero a diciembre de 2008. El mismo enrola a 347 pacientes y detecta una incidencia de 8,23 %; de los 49 individuos con diagnóstico de criptocosis, 47 son seropositivos al VIH para una incidencia de 13,54 % (Suryawanshi, Koticha, y Rajiv, 2012). Otros trabajos del mismo país con cohortes similares de pacientes reflejan incidencias inferiores a la mencionada con anterioridad (2,48 - 2,09 %) (Jaiswal, Hemwani, Sharma, Athale, y Chitnis, 2002; Lakshmi, Sudha, Teja, y Umabala, 2007).

El presente estudio identificó una mayor asociación de la coinfección VIH y *Cryptococcus* en el sexo masculino, así como en las edades comprendidas entre 20 y

30 años. Dicha asociación es una constante en los diferentes trabajos internacionales revisados. Por ejemplo, en Latinoamérica el de Lizarazo y cols., y el de Bruno y cols. El primero revela que 82,7 % de los 931 pacientes en Colombia son varones, con edades entre los 20 y 39 años (Lizarazo et al., 2007). El segundo demuestra que, de los 43 pacientes estudiados en Uruguay, 32 (74,4 %) son del género masculino, con una edad promedio de 39,1 años (rango de 21 – 69 años) (Bruno et al., 2013). En otros países como España, Colom y cols., establecen para el periodo 1998 – 1999, que de 167 centros hospitalarios, 28 documentan 58 casos de criptococosis y 20 de ellos 43 casos; en general el 88,4 % pertenecen al género masculino y más del 50 % tienen entre 30 y 40 años (Colom et al., 2001).

Estas cifras pueden estar influenciadas por el comportamiento epidemiológico de la infección por el VIH en cada país o región (MSP, 2011). Como se conoce, la infección criptocócica está condicionada en buena medida, por el deterioro de los linfocitos TCD₄⁺, un estado común en los pacientes con sida, el cual además, es más frecuente en los hombres en edad sexual activa (Hubalek, 2003).

No obstante, está bien documentada la importancia de los factores hormonales en el desarrollo de la infección criptocócica. Mediante estudios experimentales se comprueba que los ratones machos son más sensibles a la infección con *C. neoformans*/*C. gattii* (Marquis, Montplaisir, Pelletier, Mousseau, y Auger, 1985). Los ensayos de laboratorio sustentan los resultados anteriores al demostrar que la presencia de dietilestilbestrol inhibe el crecimiento *in vitro* de esta levadura (Bonifaz, 2012).

Existen trabajos que notifican la infección con *Cryptococcus* en las edades extremas de la vida; no obstante, la mayoría de los pacientes con criptococosis descritos se encuentran entre los 20 y 60 años de edad. Este hallazgo pudiera relacionarse con una mayor exposición de los adultos en edad laboral y socialmente activa durante sus prácticas cotidianas a *Cryptococcus*, saprobiótico de amplia distribución en la naturaleza (Mwaba et al., 2001).

Aunque se acepta que la principal fuente de infección para el hombre son las excretas de aves, sobre todo de las palomas, cada vez son más frecuentes las publicaciones sobre nuevas evidencias de su presencia en los sustratos más disímiles (Kidd et al., 2007).

Esto favorece el contacto del hombre con este patógeno oportunista y el posterior desarrollo del cuadro clínico cuando se rompe el equilibrio entre los factores de la inmunidad del individuo y los de patogenicidad del agente (Bowen et al., 2016; Colombo y Rodrigues, 2015; Kwon-Chung et al., 2011).

5.3. Características clínicas y principales parámetros hematológicos de los individuos seropositivos al VIH con neurocriptococosis.

El primer caso de criptococosis fue notificado en 1894 por el patólogo Otto Busse y el clínico Buschke, quienes identifican la presencia de levaduras capsuladas como la causa de un granuloma en la tibia de una mujer de 31 años de edad (Fonseca et al., 2011). Desde entonces y hasta el inicio de la epidemia global de la infección por el VIH, se describe que esta micosis se asocia al uso prolongado de terapias inmunosupresoras, al trasplante de órganos sólidos, las enfermedades malignas, los defectos inmunológicos congénitos, la sarcoidosis, así como al fallo renal y hepático avanzado, fundamentalmente (Meya, Rajasingham, Nalintya, Tenforde, y Jarvis, 2015). Sin embargo, la criptococosis solo se reconoce como una amenaza importante para la vida a partir de la década de 1980. En la actualidad, su diagnóstico se considera una medida de la eficacia de los programas de control de la infección por el VIH y permanece como un tema de máxima prioridad (Rajasingham et al., 2017).

Cryptococcus puede afectar cualquier parte de la economía, e incluso diseminarse a múltiples órganos, de lo cual depende, entre otros factores, sus manifestaciones clínicas. No obstante, es ampliamente conocido su tropismo por el SNC, en virtud de lo cual entre el 70 y el 90 % de los pacientes desarrollan meningitis o meningoencefalitis aguda, subaguda o crónica con tasas elevadas de mortalidad (Baradkar, Mathur, De, Kumar, y Rathi, 2009). Su diagnóstico depende en buena medida del índice de sospecha ya que en ocasiones su presentación puede estar enmascarada por las patologías de base y el uso de diversos tratamientos, incluyendo la TARVAE. En adición, la infección asintomática demostrada mediante la detección de antígeno criptocócico en suero, es un factor a tener en cuenta ya que aproximadamente el 11 % (hasta el 21 % en África Subsahariana) de los pacientes asintomáticos vírgenes de TARVAE desarrollan cuadro clínico con desenlace fatal (Meya et al., 2015).

El presente estudio demostró que las manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes que conformaron la muestra fueron la pérdida de peso, los vómitos y la cefalea, según el orden de frecuencia detectado. De igual forma, la evolución fue de más de un mes, situación que difiere de reportes en la literatura (Satishchandra et al., 2007).

Todos los pacientes incluidos en el estudio presentaron fiebre, pues la misma constituyó un criterio de inclusión.

Previamente, varios estudios han evidenciado la relación entre la presencia de fiebre y la neurocriptococosis, Más de la mitad de los casos de las series publicadas exhiben o no IRIS. (Antinori, 2013; Shelburne et al., 2005; R. Wang et al., 2017). Además existen amplios estudios a nivel inmunológico, en busca de los marcadores biológicos relacionados con la generación de la fiebre en este grupo de pacientes específicamente, en los que se ha determinado el incremento en las concentraciones de las citoquinas IL-6, IL-8, IFN γ y MCP-1 (proteína quimioatrayente 1 de monocitos) a nivel de LCR. (Jarvis et al., 2015).

La presencia de la tríada clínica cefalea, fiebre y vómitos se describe en la literatura como manifestaciones casi constantes de la neurocriptococosis (Satishchandra et al., 2007). De estos, la cefalea es el síntoma descrito con mayor frecuencia (90 – 100 %) (Baradkar et al., 2009; Kumar et al., 2008). Esto puede diferir de una población a otra; así por ejemplo, en el trabajo de Chipungo y cols., predomina el vómito con cifras de 68,6 % (Chipungo et al., 2015), en tanto que en el de Lizarazo, la cefalea (85,2 %), seguido de las náuseas y los vómitos (59,1 % para cada uno). En este último trabajo, la fiebre (59%) y otras manifestaciones clínicas resultan menos frecuentes (Lizarazo et al., 2007). De otra parte, las investigaciones realizadas en España por Colom y cols., demuestran que los síntomas más relevantes en la serie de pacientes incluidos en su estudio son la cefalea y la fiebre, relegando a las náuseas y los vómitos (Colom et al., 2001).

El hallazgo de pérdida de peso como manifestación más frecuente en la cohorte de pacientes incluidos en el presente trabajo, difiere de los resultados descritos por otros autores. En particular, en la muestra estudiada en este caso, menos de la mitad de los pacientes estuvo sometida a la TARVAE, como se discute más adelante. Esto pudo

favorecer el síndrome de desgaste que suelen presentar los pacientes con sida (Mangili, Murman, Zampini, y Wanke, 2006) y en consecuencia la pérdida de peso.

Acorde con la literatura consultada, las alteraciones del sensorio y las convulsiones son frecuentes en estos pacientes (Holikatti y Kar, 2012). No obstante, en el presente trabajo, el déficit motor, los signos meníngeos y las convulsiones tuvieron una menor relevancia; esto puede estar en relación con la presentación de casos con manifestaciones clínicas inespecíficas previamente documentada (Mangili et al., 2006; Meya et al., 2015). Estas variaciones pueden atribuirse, entre los factores más importantes a: i) el momento en que se realiza el diagnóstico teniendo en cuenta la duración del cuadro clínico (1 - 120 días), ii) la administración de TARVAE u otros tratamientos y iii) la presencia de afecciones concomitantes además del sida que dan lugar a diversas combinaciones de síntomas y signos (Satishchandra et al., 2007).

El análisis estadístico permitió determinar que la presencia de vómitos y déficit motor se asoció de forma significativa a la presencia de la coinfección del VIH y *Cryptococcus* en este grupo de pacientes. Colombo y Rodríguez (2015), demuestran que los desórdenes neurológicos ocasionados por la levadura se asocian a mortalidad elevada. Sin embargo, los estudios básicos dedicados a demostrar la patogénesis de este fenómeno son escasos. Hasta el momento, solo se conoce el papel de unos pocos factores que influyen en el neurotropismo de *Cryptococcus*, entre los que se describen la presencia compuestos fenólicos en el SCN. Estas sustancias están involucradas en la regulación de la actividad motora, en los procesos cognitivos y motivacionales, así como en los mecanismos de defensa, lo que pudiera explicar algunas de las manifestaciones de la infección. Estas sustancias se encuentran en mayor concentración en diferentes áreas tales como el putamen, los núcleos caudados y la sustancia gris, las cuales son afectadas primariamente por *C. neoformans* (Colombo y Rodríguez, 2015; May, Stone, Wiesner, Bicanic, y Nielsen, 2016).

Los niveles de células T CD₄⁺ y las alteraciones hematológicas correspondientes a anemia, indica que el estado general de los participantes está comprometido lo cual favorece el desarrollo de otras infecciones.

Las alteraciones de los parámetros hematológicos se consideran un factor de mal pronóstico (Xu et al., 2013). En el presente estudio, además de las manifestaciones

clínicas, estos se evaluaron para determinar el estado general e inmunológico de cada paciente. Según se reflejó en los resultados, a un alto porcentaje de los pacientes no se le determinó los niveles de linfocitos T CD₄⁺; esto impidió hacer inferencias acerca de éste parámetro. Tanto los linfocitos T CD₄⁺ como CD₈⁺ tributan a la inmunidad celular, primera línea de defensa de la inmunidad adaptativa en el aclaramiento de *Cryptococcus* de los tejidos y la evolución satisfactoria de los pacientes. En contraposición, el deterioro de esta línea celular durante la infección con el VIH, es considerado un marcador de progresión al sida y contribuye a elevar la morbimortalidad durante la coinfección, en especial cuando los conteos se encuentran por debajo de 100 células/mm³ (Eisenman, Casadevall, y McClelland, 2007).

La mayor parte de los pacientes con neurocriptococosis y VIH presentaron alteraciones hematológicas compatibles con anemia, no obstante, ese mismo grupo de pacientes presentó cantidades de leucocitos dentro de los rangos normales. Esto a su vez, constituyen *per se* alteraciones inespecíficas, que si bien pudieran contribuir a explicar en parte las manifestaciones generales del proceso infeccioso, no brindan indicios de causalidad o focalización del mismo.

En general, la sintomatología de inicio de la neurocriptococosis puede ser discreta e inespecífica, por lo que se requiere de un alto índice de sospecha para establecer un diagnóstico oportuno y certero. La presencia de la tríada de cefalea, fiebre y vómitos, acompañados de pérdida de peso, con o sin signos meníngeos en individuos seropositivos al VIH, deben ser criterios de alerta para realizar una evaluación diagnóstica de los pacientes con sospecha de esta micosis, en especial si se observa un deterioro de los parámetros hematológicos. Durante el análisis también deben tenerse en cuenta la presencia de otras enfermedades asociadas. Del diagnóstico temprano y el tratamiento consecuente oportuno y específico, dependerá en gran medida la evolución de los pacientes con neurocriptococosis.

5.4. Aislamiento e identificación del agente causal

La observación de las muestras con tinta china en busca de levaduras capsuladas es una de las herramientas más empleadas para el diagnóstico rápido de la criptococosis por su elevada especificidad, rapidez, sencillez y bajo costo (Cogliati, 2013). No obstante, su sensibilidad depende de múltiples factores tales como la pericia del observador, la

calidad del reactivo empleado, el modo de preparación de la lámina y especialmente de aquellos dependientes del agente, ya que en ocasiones las levaduras muestran morfologías atípicas que dificultan su identificación o se encuentran en cantidades por debajo del límite de detección de la técnica (10^3 - 10^4 levaduras/mL) (Bonifaz, 2012; Perfect y Bicanic, 2015). Estos factores, especialmente el último, pudieron incidir en los posibles falsos negativos del presente estudio. Es así, que en una serie de pacientes con síndrome neurológico en el mismo hospital se reportó una concordancia del 95 % de la tinta china con el aislamiento por cultivo (Barcia y Sanchez, 2016; Chen et al., 2016).

Amén de los valores de sensibilidad/especificidad intrínsecos a cada método, en virtud de lo cual algunas muestras exhiben resultados falsos negativos por al menos uno de ellos, el cultivo de la muestra se considera la prueba confirmatoria tal como sucede en la generalidad de las enfermedades infecciosas (Kwon-Chung et al., 2011; Perfect y Bicanic, 2015). El mismo permite no solo demostrar la viabilidad del agente causal, sino su identificación según el género, la especie, el serotipo, el tipo de apareamiento, así como la variedad genética, la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos, la presencia de atributos de patogenicidad y la relación genética entre los diferentes aislados. Estos aspectos cobran cada vez mayor relevancia clínica y epidemiológica.

La limitante principal del cultivo está dada por el tiempo requerido para obtener los resultados, lo cual conspira con la inmediatez necesaria para la definición del tratamiento en estos casos (Bonifaz, 2012). Además de esto, se conoce que su sensibilidad está influenciada por factores tales como: i) la administración previa de tratamientos antifúngicos; ii) la representatividad de la muestra según el proceso infeccioso; iii) el volumen de la misma por cuanto Boulware et al., 2014 demuestran que la carga mínima detectable de *C. neoformans* varía de 100 a 10 UFC/mL cuando se inoculan 10 y 100 μ L de LCR respectivamente; iv) las condiciones específicas de transporte y conservación según el tipo de muestra y el microorganismo y v) la selección de los medios de cultivo y las condiciones de incubación (Arenas, 2014; Bonifaz, 2012).

En esta investigación, la administración de antifúngicos hasta un mes antes de la toma de la muestra constituyó una limitante para formar parte de la misma. De forma adicional, ninguna de las muestras con resultados contradictorios provenía de pacientes

bajo régimen de tratamiento antirretroviral; sin embargo, no se previó en el diseño de la encuesta, la administración de sustancias que pudieran afectar en algún grado la viabilidad de las levaduras. La representatividad de la muestra, así como su cantidad estuvieron garantizadas pues para el diagnóstico de encefalitis/meningoencefalitis, la muestra ideal es el LCR y entre los criterios de inclusión se tuvo en cuenta su volumen ($\geq 3\text{mL}$) y calidad. No obstante, en casos de baja celularidad, pudiera correrse el riesgo de que el volumen inoculado, aun cuando sea el recomendado, no contenga el número de levaduras necesarias para su detección; esto es válido, en especial si antes de la siembra se utiliza parte del sedimento para realizar el examen directo, tal como recomienda la literatura clásica sobre el tema (Arenas, 2014; Bonifaz, 2012). Aunque se previeron las medidas pertinentes para el procesamiento de las muestras, fue preciso su traslado del Hospital al laboratorio de micología de la UEES, período durante el cual (máximo 120 minutos) pudo afectarse la viabilidad de las levaduras. Estas razones pudieran considerarse como posibles explicaciones a la discordancia entre ambos métodos. El conocimiento exhaustivo de las limitaciones de las técnicas disponibles y la combinación de tantas como sea posible, pudiera mejorar la sensibilidad general del diagnóstico de la criptococosis. En general, estas fortalezas y limitaciones deben tenerse en consideración durante la planeación de otros trabajos en el futuro.

En la actualidad existen métodos con sensibilidad y especificidad cercanas al 100 % tales como la detección de ADN mediante pruebas de biología molecular y de antígeno por inmunocromatografía (Graciele-Melo, Rocha-Silva, Christo Paulo, y Caligiorne Rachel, 2016; Hansen et al., 2013). Esta última no requiere de equipamientos adicionales para la conservación del diagnosticador o el desarrollo de la técnica, ni personal altamente calificado, ofrece resultados en solo 10 minutos, es simple de realizar y reconoce todos los serotipos del complejo de especies. Dadas estas ventajas la OMS la recomienda como prueba de campo para el diagnóstico precoz de infección por *C. neoformans/C. gattii* (Boulware et al., 2014; Hansen et al., 2013; Vidal y Boulware, 2015). No obstante su precio hace que no esté accesible en todos los lugares donde se necesita y hasta el momento no se encuentra disponible en el Hospital de Infectología de Guayaquil. En consonancia con esto, tampoco estuvo disponible la detección de ADN específico a partir de las muestras clínicas, por ser pruebas costosas y requerir condiciones adicionales (Graciele-Melo et al., 2016).

Para la identificación de las levaduras también existen varios métodos, en su mayoría basados en las propiedades fisiológicas de cada género y especie. Algunos como el API® 20C AUX (bioMérieux SA, 2007), se encuentran difundidos en los laboratorios de micología por las bondades que reúne y por lo cual se decidió su empleo en el presente estudio. Otros como el MALDI-TOF, ganan cada vez mayor popularidad por su elevada sensibilidad, especificidad y rapidez en la obtención de resultados. Estos factores son determinantes en la instauración de terapias oportunas y específicas, pero al igual que la detección de Ag por inmunocromatografía y de ADN por PCR, su precio limita la generalización de su uso. En el presente estudio, el compendio de pruebas empleadas, tanto convencionales como comerciales, permitió identificar a todos los aislados recuperados a partir de LCR como *C. neoformans*.

C. neoformans se encuentra distribuido de forma amplia en el globo terráqueo y afecta fundamentalmente a los pacientes inmunocomprometidos (Cogliati, 2013; Meyer et al., 2003). Dado que el presente trabajo tuvo como universo a los pacientes seropositivos al VIH que asistieron al Hospital de Infectología de Guayaquil durante un período determinado, las probabilidades de recuperar esta última especie se correspondió con lo publicado en la literatura internacional. Otros países de la región describen el aislamiento de *C. gattii* tanto a partir de muestras ambientales como clínicas; sin embargo, estas últimas suelen corresponder con pacientes seronegativos al VIH (Casadevall, Freij, Hann-Soden, y Taylor, 2017; Firacative et al., 2016).

Como se menciona a lo largo del documento, el presente estudio es el primero en abordar de forma integral la criptococosis en el contexto de la infección por el VIH en Ecuador. Sus resultados contribuyen a las bases teóricas sobre el tema específico y aporta nuevas evidencias a las ya conocidas tanto en Latinoamérica como en el mundo.

5.5. Caracterización genética de los aislados recuperados

La caracterización de los aislados puede ser de gran utilidad en el manejo de los pacientes afectados por criptococosis. Por ejemplo, en la actualidad se conoce la repercusión clínica de la infección por el tipo *MAT α* , el cual presenta una mayor tendencia a la diseminación meníngea (La Hoz y Pappas, 2013). Por su parte, la identificación del genotipo puede permitir predecir la evolución del cuadro clínico y la respuesta terapéutica. Esto está en función de la hipervirulencia de alguno de ellos y las

diferencias de los valores de corte en cada caso para los antifúngicos más importantes (Espinel-Ingroff, Aller, et al., 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, et al., 2012).

Aunque la mayoría de los laboratorios no aplican los métodos moleculares al diagnóstico de rutina, estos se emplean para la detección de secuencias genéticas específicas del complejo *C. neoformans*, tanto a partir de las muestras clínicas como de los cultivos (Bovers et al., 2008; Wengenack y Binnicker, 2009). Estas herramientas permiten la identificación de las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* y aportan resultados más completos que el diagnóstico convencional. Esto contribuye a una mejor comprensión de la epidemiología e historia natural de la criptococosis (Arvanitis et al., 2014; Firacative et al., 2012).

Uno de los métodos más empleados es el RFLP, basado en el análisis del polimorfismo de un fragmento amplificado y digerido posteriormente con endonucleasas, en este caso *Sau96I* y *HhaI*. Los estudios de epidemiología molecular demuestran que esta técnica se puede aplicar al diagnóstico de casos específicos y para la detección rápida de los serotipos y los tipos moleculares del complejo *C. neoformans* (Kidd et al., 2007; Wieland Meyer et al., 2003). No obstante, la misma presenta entre sus principales limitaciones, además de la compleja interpretación de los resultados, el gran número de pasos que conlleva el proceso, la cantidad de reactivos y equipamientos requeridos, así como la demanda de ADN de alta calidad, un factor crucial para la obtención de resultados confiables (Sidrim et al., 2010).

El empleo de la secuencia del gen *URA5* es una de las más utilizadas. A pesar de su elevada sensibilidad, en tres de los 27 aislados del presente estudio no se obtuvo ningún producto después de la amplificación de este fragmento. Este fenómeno pudo deberse a la inhibición de la reacción de amplificación o cantidad insuficiente de material genético de la levadura, no obstante una de estas contingencias fue solventada con la utilización de controles positivos y negativos. A pesar de esto, la concordancia del RFLP con el método convencional adoptado para la identificación en este estudio fue adecuado. Este resultado demuestra que el mismo es útil en la identificación micológica, en especial, cuando se combina con otros métodos.

De forma uniforme, todos los aislados para los cuales se logró la amplificación del gen *URA5* correspondieron al serotipo A *MAT* α genotipo VNI. Este resultado es similar al

de diferentes investigadores de la región. El de Sánchez y cols., en Bogotá, por ejemplo, muestra un amplio predominio de *C. neoformans*; el trabajo incluye 35 aislados, entre los cuales el 93 % corresponde a *MAT α* y el 82,9 % a VNI vs 52,6 % VGII (Sánchez, Escandón, y Castañeda, 2008). Los informes de Igreja, Delgado y da Silva en Brasil, demuestran que la mayoría de las levaduras de este género recuperadas a partir de pacientes con VIH (30, 45 y 40 respectivamente) corresponden a *C. neoformans* VNI (Da Silva et al., 2012; Delgado et al., 2005; Igreja et al., 2004). Recientemente, Illnait-Zaragozí y cols. de Cuba, señalan que el 100 % de los más de 100 aislados de *Cryptococcus* autóctonos de este país corresponden al serotipo A, *MAT α* , AFLP1 (VNI) (Illnait-Zaragozi et al., 2014).

Los trabajos de otras latitudes muestran cifras similares. En Seúl a partir de 46 aislados, se determina mediante RFLP y MLST que todos pertenecen al serotipo A α y variedad molecular VNI (Park, Kim, Joo, y Hwang, 2014). Así mismo, de 57 aislados clínicos del complejo *C. neoformans/C. gattii* procedentes de La India, se identifican 51 *C. neoformans* VNI, un *C. neoformans* VNIV y solo cinco *C. gattii* VGII (Jain et al., 2005).

De igual forma, los resultados de este trabajo de tesis estuvieron en total correspondencia con los metanálisis sobre la epidemiología molecular global de *C. neoformans* y *C. gattii*. Dicho estudio brinda información valiosa sobre las variedades moleculares circulantes en nueve países de Latinoamérica (Cogliati, 2013; Wieland Meyer et al., 2003). La encuesta epidemiológica desarrollada en Colombia, sobre criptococosis publicada en 2007, revela que el serotipo más frecuente en ese país, entre 1997-2005 es el A (95,9 %) (Lizarazo et al., 2007).

Trabajos más recientes encaminados a demostrar el origen de este agente sugieren que hace ~ 100 millones de años, cuando surgieron los continentes actuales, ambas especies del complejo tenían un ancestro común. A partir de entonces y durante el proceso adaptativo, comenzó su diferenciación hasta las especies que conocemos hoy (Casadevall et al., 2017). A pesar de ser morfológicamente similares, compartir los mismos mecanismos de virulencia y causar enfermedades relacionadas, las evidencias actuales apuntan a que el fenómeno de adaptación a los diferentes ambientes naturales pudiera jugar un papel importante en la selección de vías metabólicas que

secundariamente determinan la patogénesis de la infección y la selección de individuos susceptibles en cada especie (Rhodes et al., 2017)

Todos estos resultados en su conjunto, constituyen evidencias de la prevalencia de la especie *C. neoformans*, en especial el genotipo VNI en los pacientes seropositivos al VIH con independencia de la latitud o región geográfica de origen de los pacientes. Por su parte, las restantes especies y genotipos parecen tener una localización más restringida o estar asociados a otras condiciones predisponentes como la edad o la visita de individuos susceptibles a las respectivas áreas endémicas (Hagen et al., 2015).

Hoy se conoce que la reproducción de *C. neoformans/C. gattii* es posible tanto entre células del tipo de apareamiento opuesto como del mismo sexo (Kozubowski y Heitman, 2012). Esta última 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 la oportunidad de colonizar satisfactoriamente nuevos ambientes (Metin, Findley, y Heitman, 2010). Los estudios de infección experimental indican que las células *MAT α* son más virulentas al ocasionar infección diseminada en el SNC, con mayor frecuencia en relación con las del *MAT α* (Kozubowski y Heitman, 2012; Matsumoto, Fusco-Almeida, Baeza, Melhem, y Medes-Giannini, 2007; Metin et al., 2010).

Hasta el momento, los resultados del presente estudio constituyen las únicas evidencias publicadas sobre la circulación de *C. neoformans* A α VNI en Ecuador y pueden servir de referencia para estudios futuros en el país, la región y en el mundo.

5.6. Sensibilidad *in vitro*

Según Chiang y cols., *C. neoformans* representa la cuarta causa de egreso por infección oportunista en el Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador (Chiang et al., 2011). Conocer la efectividad de los antifúngicos recomendados en la primera línea de tratamiento (anfotericina B, fluconazol y flucitosina) para esta micosis pudiera marcar la diferencia en el desenlace, con frecuencia fatal, en la infección por este agente.

Los efectos adversos de estos fármacos generados por sus mecanismos de acción y el surgimiento de aislados resistentes, constituyen una limitante para su uso.

La anfotericina B, comercializada a partir de 1957, se convirtió en la principal alternativa en el tratamiento de las micosis profundas debido a su amplio espectro de acción. Actúa como fungicida o fungistático según la dosis. El fármaco se une al ergosterol de la membrana citoplasmática de eucariontes, incrementa la actividad de los canales de potasio y a concentraciones mayores, forma poros en la membrana. La pérdida de potasio intracelular y de otras moléculas trae como consecuencia la disminución de la viabilidad del hongo (Catalan y Montejo, 2006; Cuenca-Estrella, 2010). Debido a que el ergosterol también se encuentra en las células humanas, ocasiona diversos efectos adversos. Entre estos se describen la toxicidad renal reversible asociada a disminución de la perfusión renal, la toxicidad renal irreversible asociada a daño tubular, la anemia por deficiencia de eritropoyetina y la aracnoiditis química después de la aplicación intratecal (Thompson, 2002).

Su uso en la clínica no es sistemático ya que los tratamientos con este antifúngico son largos y los efectos adversos provocados deterioran la calidad de vida de los pacientes (Moghnieh et al., 2015; Wade et al., 2013). El advenimiento de la formulación liposomal de este antifúngico brinda una mejor opción, pues su efectividad, perfil de farmacocinética y tolerabilidad superan el de otras presentaciones del mismo (Azanza y Barberán, 2012). Su principal inconveniente es la poca accesibilidad debido a su costo más elevado en comparación con el desoxicolato que es la forma convencional (Stone, Bicanic, Salim, y Hope, 2016).

Al comparar los resultados de la sensibilidad *in vitro* a la anfotericina B obtenidos en esta tesis con los informados en el mundo, se constató que hubo resultados coincidentes. Un ejemplo claro de esta situación es el estudio realizado por Mdodo y cols., en Kenia, en el cual la totalidad de los aislados de *C. neoformans* (n = 67) son sensibles a este medicamento (Mdodo et al., 2011). Los valores de CIM que muestra la anfotericina B, tanto en éste como en estudios internacionales, demuestran su efectividad sobre esta levadura (Badali et al., 2015; Bejar et al., 2015; Bertout et al., 2013; Hagen et al., 2013; Kammalac Ngouana et al., 2016; Li et al., 2012; Mdodo et al., 2011; Mlinaric-Missoni et al., 2011; Silva, Rabelo, Terra, y Teixeira, 2008; Tangwattanachuleeporn et al., 2013). Sus mecanismos de resistencia son poco conocidos y en su mayoría están relacionados con el descenso en la cantidad de ergosterol de la membrana o al aumento de los fosfolípidos. Estas alteraciones reducen

la interacción del fármaco con su molécula diana, se asocian con mutaciones en los genes *ERG2* o *ERG3* los cuales codifican enzimas que participan en la vía de síntesis del ergosterol y son poco frecuentes (Cuenca-Estrella, 2010; Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). Hoy los estudios encaminados a demostrar posibles causas de fallos terapéuticos durante el uso de este antifúngico van encaminados a determinar los niveles séricos de la misma en los pacientes bajo tratamiento (Andes, Pascual, y Marchetti, 2009; Smith y Andes, 2008)

La flucitosina es un derivado fluorado de la citosina y es el único antifúngico de uso clínico perteneciente a la clase de las pirimidinas. Su administración se recomienda en combinación con la anfotericina B durante la fase de ataque del tratamiento (Day et al., 2013; Perfect et al., 2010; WHO, 2011). Es un fármaco fungistático que, después de penetrar en la célula, sufre varias transformaciones hasta generar ácido 5-fluoruracílico. Este se incorpora a la cadena de ARN ocasionando la producción de moléculas aberrantes y la inhibición celular. Sus efectos adversos más graves dependen de la dosis; después de ser absorbido desde el intestino, causa toxicidad hepática y de la médula ósea que se traducen en leucopenia, trombocitopenia reversibles, eosinofilia y exantema, fundamentalmente (Catalan y Montejo, 2006; Cuenca-Estrella, 2010; Thompson, 2002).

Existen estudios alentadores sobre la sensibilidad de *Cryptococcus* frente a la flucitosina (Bertout et al., 2013; Kammalac Ngouana et al., 2016; Li et al., 2012; Mdodo et al., 2011; Mlinaric-Missoni et al., 2011). De manera cualitativa, los resultados obtenidos del presente trabajo fueron similares a los expuestos con anterioridad; sin embargo, los valores de CIM difieren, lo que pudiera depender de las condiciones propias de cada localización o región (Chowdhary et al., 2011; Hagen et al., 2013; Kammalac Ngouana et al., 2016). Entre los ejemplos más evidentes se encuentra el estudio realizado en Croacia y publicado por Mlinaric-Missoni y cols., quienes incluyen 48 aislados de *C. neoformans* recuperados de 10 pacientes seronegativos al VIH y cinco de seropositivos al VIH. En este caso, la inhibición de dichos aislados se logra con concentraciones de flucitosina que oscilan entre 1 y 4 µg/mL. Estas concentraciones son al menos dos veces más elevadas que lo encontrado en la presente investigación (Mlinaric-Missoni et al., 2011).

La flucitosina fue comercializada desde los años sesenta del siglo XX. Desde entonces se recomienda en tratamientos combinados con la anfotericina B. La principal limitación de dicha combinación, viene determinada por la afectación renal causada por esta última. Esto se debe a que un 80 % de la fluorocitosina se elimina por la orina y al disminuir la eliminación de la pirimidina, se intensifican sus efectos adversos en la médula. Por otra parte, la resistencia a este fármaco aparece con frecuencia debido a mutaciones en el gen que codifica la enzima que convierte el antifúngico en su forma activa (Cuenca-Estrella, 2010; Cuenca-Estrella y Rodriguez-Tudela, 2010). A pesar de esto, la combinación de anfotericina B y fluorocitosina continúa siendo el tratamiento de elección de la criptococosis en enfermos con sida (Day et al., 2013; Perfect et al., 2010; WHO, 2011); sin embargo, debido a las razones antes expuestas, en la actualidad apenas se utiliza y la misma no está disponible en el hospital de infectología de Guayaquil. Esto último pudiera justificar el alto grado de susceptibilidad a este medicamento hallado en el presente estudio.

El fluconazol es un fungistático sintético del grupo de los triazoles. El mismo bloquea la conversión del lanosterol en ergosterol, altera la permeabilidad de la membrana y daña ultraestructuras del hongo; de forma adicional, produce acumulación de peróxido de hidrógeno que lesiona de forma directa los organelos intracelulares (Catalan y Montejo, 2006). En general los triazoles, muestran una afinidad cientos de veces superior por las enzimas fúngicas que por las enzimas humanas, de ahí que posean menos toxicidad que otros azoles y puedan administrarse a dosis más elevadas (Cuenca-Estrella, 2010). A pesar de esto, si la terapéutica no se administra a las dosis indicadas durante suficiente tiempo, pueden producirse recaídas de la infección. Entre los efectos adversos más comunes, se describen los relacionados con la intolerancia gastrointestinal (náusea, vómito, dolor abdominal) y las alteraciones de las pruebas hepáticas (Catalan y Montejo, 2006; Thompson, 2002).

Todos los controles realizados durante la preparación de los medios y la ejecución de las pruebas de susceptibilidad resultaron según lo esperado. Sin embargo, la elevada frecuencia de resistencia al fluconazol en los aislados recuperados en la presente investigación decidió la confirmación de los mismos mediante un método alternativo. Más adelante, en este mismo aparte, se brindan algunas consideraciones sobre este aspecto.

La literatura consultada reconoce la buena concordancia para el fluconazol del *Sensititre Yeast One* con la microdilución en medio líquido independientemente de los parámetros empleados (EUCAST o CLSI). Los diferentes trabajos de Cuenca-Estrella y cols. demuestran un porcentaje de concordancia superior al 95 % y que este genera un número menor de errores mayores en comparación con otros métodos (Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2010). Estos datos hacen elegible al sistema como un buen sustituto de los métodos de referencia, al menos en laboratorios con escasa infraestructura.

En la actualidad se conocen 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, iii) la sobreexpresión 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, se conoce que algunos aislados 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 está previamente descrito en ambas especies del complejo *C. neoformans* (Varma y Kwon-Chung, 2010). El alcance de esta tesis no contempló la determinación de estos mecanismos en los aislados recuperados con resistencia al fármaco.

Las investigaciones realizadas por Fernández y cols., y Silva y cols., reflejan que la resistencia al fluconazol en Cuba y Brasil respectivamente, se comporta entre el 5 y 8 %; no obstante, su efectividad puede llegar al 60 % (C. Fernández, Martínez, González, y Pimentel, 1999; Silva et al., 2008). Existen casos particulares como el referido por Bertout y cols., en Camerún, quienes observan resistencia al fluconazol en 14 de 133 aislados. De la misma manera, Guinea y cols., muestran porcentajes más elevados, ya que el 20 % (2/48) de los provenientes de pacientes con VIH, exhiben resistencia al fluconazol. No obstante, en ambos estudios todos los aislados resultan

sensibles a otros antifúngicos, en especial a la nueva generación de triazoles (posaconazol, isavuconazol y voriconazol) (Bertout et al., 2013; Guinea et al., 2010).

La resistencia de *Cryptococcus* al fluconazol en el presente trabajo pudo estar relacionada con el hecho de que este es el único triazol utilizado en el hospital de procedencia de los pacientes objeto de estudio y el mismo se emplea, con regularidad en el tratamiento de las micosis de forma general. La candidiasis en particular, suele ser una de las principales causas de morbilidad en los individuos infectados por el VIH (Bolduc, Roder, Colgate, y Cheeseman, 2016; Schmiedel y Zimmerli, 2016; Sharma, Oberoi, Vohra, y Nagpal, 2015), por lo que la posibilidad de que éstos tuvieran una infección subclínica o latente por *Cryptococcus* y que estas levaduras desarrollaran resistencia a partir de la exposición al medicamento durante tratamientos previos, resulta difícil de probar pero no se debe descartar.

De forma adicional, durante las últimas décadas se constata un incremento de la presión selectiva debido al empleo de azoles de uso agrícola para el control de plagas. Esto parece estimular el desarrollo de aislados con sensibilidad disminuida o resistentes a este grupo de antifúngicos debido al fenómeno de resistencia cruzada (Kanafani y Perfect, 2008; May et al., 2016; Serfling, Wohlrab, y Deising, 2007). Al igual que en la hipótesis anterior, ésta es imposible de corroborar en el marco del presente estudio, pero tampoco debe ser desechada dada la ubicuidad de esta levadura en el medio ambiente (Bonifaz, 2012; Perfect y Bicanic, 2015).

Las hipótesis anteriores se encuentran sustentadas además, por antecedentes como el trabajo publicado por Sykes y cols., quienes demuestran la reducción de la susceptibilidad a fluconazol de aislados clínicos de *Cryptococcus* durante la terapia con este antifúngico. En esa investigación, los autores demuestran mediante MLST que los aislados recuperados pre- y pos- tratamiento son isogénicos y que no existe diferencias en las secuencias de *ERG11* ni *PDR11*. En su lugar encuentran una sobre expresión de estas bombas de expulsión activa, secundaria a la exposición al triazol (Sykes et al., 2017).

La microdilución en medio de cultivo líquido constituye el método de referencia para el análisis de la CIM en levaduras. Este es un método laborioso que requiere de un personal entrenado y se encuentra reservado sobre todo a los laboratorios

especializados. Debido a esto, surgen nuevas alternativas menos engorrosas para su realización, con buena reproducibilidad y correlación con el método de referencia. Una de ellas es el E-test, el cual se utilizó en el presente estudio (Tapia, León, y Palavecino, 2003).

Esta prueba se basa en el método de difusión en agar a partir de una tira impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, característica que le permite determinar la CIM mediante la lectura de una elipse de inhibición. Este método fue aprobado por la FDA y es uno de los más eficaces para detectar resistencia a la anfotericina B, los triazoles y la flucitosina en especies de *Candida* y *Cryptococcus* (Chavez et al., 2010; Tapia et al., 2003).

El grado de concordancia entre el E-test y el método de microdilución, depende del medio de cultivo empleado para su realización. El más recomendado es el RPMI 1640 con 2 % de glucosa, el cual se utilizó en el presente estudio (CLSI, 2012). Este medio enriquecido permite el crecimiento de las levaduras, mejora la lectura de los halos de inhibición (punto de corte) y minimiza el fenómeno de *trailing* o cola, el cual de forma frecuente dificulta la lectura e interpretación en los estudios de sensibilidad a los antifúngicos y la correlación con el método de referencia, la cual puede variar desde 61,7 hasta 91 % (Pemán et al., 2007; Tapia et al., 2003).

Thompson y cols., demuestran estas afirmaciones al someter 92 *Cryptococcus* a ambos procedimientos. El estudio determina un 97,8 % de concordancia y permite concluir que el E-test es un método confiable para la determinación de la CIM en estas levaduras (Thompson et al., 2008). Por su parte, Petrou y Shanson ponen a prueba ambos métodos sobre cinco medios de cultivos diferentes: YNB con pH 5,6; YNB con pH 7,0; RPMI 1640 con y sin glucosa al 2 % y RPMI 1640 con fosfato. En este caso, los autores determinan que los mejores resultados corresponden a YNB con pH de 7,0 y al RPMI 1640 con glucosa al 2 % las cuales mostraron la misma eficiencia para la determinación de la CIM en *Cryptococcus* (Petrou y Shanson, 2000).

Las evaluaciones previas de los sistemas comerciales empleados y el uso sistemático de los controles de calidad durante el desarrollo de la presente investigación, permiten avalar los resultados que se obtuvieron en la misma. Estos constituyen una alerta sobre la emergencia de resistencia a una de las principales armas en el tratamiento de las

micosis, en particular de la criptococosis. Tanto esta información como los hallazgos sobre las variedades moleculares de *Cryptococcus* recuperadas de los pacientes positivos al VIH en Guayaquil, constituyen la primera información autóctona disponible en Ecuador sobre esta temática. Este trabajo demuestra la necesidad de dar seguimiento de estos resultados y de adecuar las pautas de tratamiento vigentes en este país, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados.

5.7. Recuperación de *Cryptococcus* a partir de fuentes naturales

Las infecciones fúngicas representan un verdadero desafío para la salud pública. Además de ocasionar cuadros invasivos pocas veces sospechados y de mortalidad elevada, los agentes que las ocasionan son ubicuos en la naturaleza y la exposición a los mismos es casi imposible de evitar (Cogliati et al., 2016; Rajasingham et al., 2017).

En particular la criptococosis, compromete la vida de los pacientes y se desarrolla a partir de la inhalación y diseminación de conidias o levaduras disecadas de *C. neoformans/C. gattii* (May et al., 2016). Las especies de este complejo son de vida libre y pueden sobrevivir en disímiles nichos ecológicos. Como se menciona con anterioridad, los serotipos A y D presentan una distribución universal y afectan por lo general a individuos inmunodeficientes; por su parte los serotipos B y C, suele tener una distribución geográfica más restringida a las zonas tropicales y subtropicales y causar infección en individuos aparentemente inmunocompetentes. No obstante, hallazgos recientes demuestran la presencia de estos últimos serotipos en localizaciones inesperadas. Esto se debe a su capacidad de adaptación a nuevos ambientes y a la importación de la infección desde zonas endémicas (Cogliati, 2013; Illnait-Zaragozi et al., 2011; Illnait-Zaragozi et al., 2010; Trilles et al., 2014).

La distribución de *C. neoformans* en la naturaleza está documentada en diferentes estudios, tanto en los países de la región cuyas condiciones climáticas son similares a las de Ecuador, como donde existe una vasta distribución del reservorio animal. Entre los que sustentan esta afirmación se encuentran los trabajos desarrollados por Reolon y cols. en la ciudad de Porto Alegre, Brasil y el metanálisis de Cogliati y cols. en la cuenca del Mediterráneo. En el primero los autores demuestran que el 100 % de los aislados recuperados de excretas de palomas corresponde a *C. neoformans*. En el segundo se analizan 6 436 muestras de 3 765 árboles y se evidencia que el 5 % de los

mismos estaban colonizados por *Cryptococcus* (117 *C. neoformans* y 13 *C. gattii*) (Cogliati et al., 2016; Reolon, Perez, y Mezzari, 2004). Otro trabajo reciente en Tailandia analiza las excretas de palomas de 11 distritos de Bangkok. El resultado pone al descubierto la presencia de *C. neoformans* (n = 18) a partir de 164 muestras (Krangvichain, Niyomtham, y Prapasarakul, 2016).

Tal y como demuestran los autores recién mencionados y la literatura clásica, la presencia de *C. neoformans* en la naturaleza se asocia a excretas de aves, fundamentalmente de palomas (Perfect y Casadevall, 2002). A pesar de esto, hoy se considera que dichas excretas, solo sirven de sustrato a las levaduras ya existentes en los árboles, al encontrar condiciones que favorecen su sobrevivencia y multiplicación (Perfect y Casadevall, 2002). Esta hipótesis surgió al reconocer la especialización de *C. neoformans/C. gattii* en la degradación de lignina como fuente de nutrientes durante el crecimiento saprófito basada en la actividad de su enzima lacasa; esto sugiere además, que no está asociado con algún tipo de planta en particular (Lazera et al., 2000). De hecho, desde que Ellis y Pfeiffer recuperaron por primera vez *C. gattii* a partir de *Eucalyptus camaldulensis* el mayor número de referencias se relacionan con estos árboles; sin embargo, cada vez es posible encontrar en la literatura más trabajos que demuestran la presencia del complejo de levaduras en un espectro amplio de especies plantas (Chowdhary et al., 2011).

Varios autores, entre ellos Alves y cols., demuestran *Cryptococcus* spp., a partir de muestras ambientales con ayuda del AAC. En ese estudio en particular, los autores colectan 506 muestras durante los años 2012 y 2014 en zonas urbanas de Manaus, Brasil (191 excretas de palomas, 60 excretas de otras aves en cautiverio y de 255 árboles) de las cuales recuperan 13 aislados de *Cryptococcus* (Alves et al., 2016). Tanto el AAC, como la metodología empleada para los estudios ambientales en la presente investigación, se encuentran avalados por la literatura internacional (Chowdhary et al., 2011; Kidd et al., 2007; Randhawa et al., 2005).

Debido a que el Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña”, acoge a más de un tercio de los individuos seropositivos al VIH de Ecuador, se convierte en un denominador común para los mismos durante sus visitas a consultas e ingresos hospitalarios (Lugmaña, 2014). Esto lo colocó en situación ventajosa a la hora

de seleccionar el sitio para el muestreo ambiental, pues realizar el mismo según el lugar de residencia de los pacientes resultaría complejo dada la dispersión geográfica de los mismos.

A pesar de todas las consideraciones anteriores, durante la presente investigación no se logró recuperar levaduras de *Cryptococcus* de ninguna de las muestras colectadas. Este resultado refleja el de otros trabajos como el realizado en Curitiba, Brasil, donde es imposible demostrar su presencia en sitios aledaños a los hospitales y en Cuba a partir de 662 hisopados de cavidades o ranuras profundas obtenidas de 331 ejemplares adultos de plantas de áreas públicas de zonas urbanas (Ilnait-Zaragozi et al., 2012; Spina-Tensini et al., 2017).

Estos resultados pudieron estar influenciados por varios factores tales como los medioambientales y el número de muestras. La demostración de posibles fuentes de infección, en especial si se trata de lugares públicos, constituye un eslabón fundamental en el control de las enfermedades infecciosas. El hecho de no haber logrado aislar *Cryptococcus* a partir de las fuentes naturales que se estudiaron, indica la necesidad de ampliar el estudio e introducir nuevas variables que permitan esclarecer las interrogantes planteadas.

DISCUSIÓN GENERAL

Desde su inicio modesto, con la publicación del primer caso en 1895 hasta la actualidad, *C. neoformas/C. gattii* alcanza un lugar cimero en la micología clínica como la “levadura asesina con cubierta de azúcar”. De los dos millones de casos al año que causan las infecciones fúngicas invasivas, este agente es responsable de casi la mitad (Brown et al., 2012; Perfect y Bicanic, 2015; Rajasingham et al., 2017).

La historia natural de la infección se encuentra documentada, su diagnóstico a diferentes niveles está bien establecido y los principios de su tratamiento están avalados por los estudios clínicos más robustos. A pesar de esto, la infección 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 (Perfect y Casadevall, 2002; Rajasingham et al., 2017).

Hasta el momento los estudios relacionados sobre la criptococosis en Ecuador son escasos y los existentes se limitan a la descripción parcial del problema (Chiang et al., 2011; Jarrín et al., 2012; Khawcharoenporn et al., 2006; Paúl y Cardona, 2008; Paz, 2014; Tircio y Vallejo, 2014). Estos antecedentes fueron los que motivaron el presente trabajo de tesis conducido por el Laboratorio Nacional de Referencia de Micología del IPK de La Habana, Cuba y Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UEES. Este estuvo encaminado a: conocer el comportamiento de la neurocriptococosis en los pacientes seropositivos al VIH que asisten al Hospital de Infectología de Guayaquil, determinar las principales características microbiológicas de su agente causal, así como la presencia de posibles fuentes naturales de infección por esta levadura en áreas aledañas al hospital al que concurren estos pacientes.

Principales limitaciones del estudio

Entre los aspectos detectados en el transcurso del trabajo y que pudieron dar lugar a sesgos en la interpretación de sus resultados se encuentran:

- La inserción de la fiebre como criterio de inclusión de los pacientes ya que inicialmente el trabajo se concibió para el estudio del síndrome febril en individuos seropositivos al VIH ingresados en el Hospital de Infectología de Guayaquil. No obstante, este propósito no fue factible debido a limitantes financieras que surgieron después de iniciada la tesis. Esto condujo a que el 100 % de los individuos enrolados en la misma presentaran esta manifestación, con lo cual se perdió la posibilidad de todo tipo de análisis estadístico.
- La imposibilidad de poder completar los estudios de los niveles de células CD4 y carga viral debido a la no disponibilidad de estos exámenes en el hospital durante el período que comprendió la investigación. Según los criterios de exclusión establecidos, este aspecto debió considerarse como una invalidante para participar en la tesis con lo cual, en teoría, solo quedarían incluidos menos de la mitad de los pacientes. Esto impidió arribar a conclusiones certeras sobre la relación de estos parámetros con el proceso en estudio.
- La no disponibilidad del método de referencia para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antifúngicos frente a los aislados recuperados ni de pruebas moleculares para la detección de los mecanismos de resistencia. Esto imposibilitó confirmar por el método recomendado internacionalmente los hallazgos de aislados resistentes a las drogas estudiadas. Como alternativa se empleó otro método comercial.
- No se previó en el diseño de la encuesta el consumo por parte de los pacientes de sustancias que pudieran afectar en algún grado la viabilidad de las levaduras durante el proceso de su recuperación, ni las condiciones de conservación del LCR desde el sitio de extracción hasta el laboratorio. Esto dejó abierta una interrogante sobre las posibles causas de falsos negativos en el cultivo micológico.
- Las limitaciones financieras antes mencionadas, también impidieron ampliar los estudios ambientales con el objetivo de determinar las posibles fuentes de infección por *Cryptococcus*. A pesar que el número de muestras estudiadas fue relativamente pequeño y que en ninguna de ellas se recuperó esta levadura, este trabajo constituye

una de las primeras evidencias de este tipo de estudio en Ecuador y pueden servir de guía para trabajos futuros.

A pesar de estas limitaciones el trabajo permitió dar respuesta en buena medida a las preguntas de investigación que dieron pie a la propuesta.

¿Cómo se comporta la neurocriptocosis en los pacientes seropositivos al VIH que asisten al Hospital de Infectología de Guayaquil?

Las encuestas realizadas a los enfermos que consintieron participar en la investigación reveló el predominio de la infección por el VIH en los hombres en edad laboralmente activa, comportamiento similar al de la epidemia causada por este virus en Ecuador y el mundo (MSP, 2011; OMS, 2014). No obstante, el presente estudio demostró una prevalencia de la coinfección VIH/*Cryptococcus* superior a la descrita en la mayoría de los países de Latinoamérica y en otras regiones del mundo (Bruno et al., 2013; Jaiswal et al., 2002; Lakshmi et al., 2007; Lizarazo et al., 2007; Suryawanshi et al., 2012).

Se conoce que hasta el 90 % de los pacientes infectados por *C. neoformans/C. gattii*, desarrollan cuadros neurológicos, por lo cual estos se consideran la presentación más frecuente e importante (Baradkar et al., 2009; Colombo y Rodrigues, 2015). Las manifestaciones clínicas en el grupo de pacientes estudiados fueron inespecíficas, lo que corrobora lo publicado a nivel internacional acerca de la variedad de signos y síntomas relacionados con esta entidad nosológica (Bolduc et al., 2016; Bowen et al., 2016; Bruno et al., 2013). Además de la fiebre, considerada como criterio de inclusión en el presente estudio, de manera inesperada la pérdida de peso constituyó el signo más frecuente. Es probable que este hallazgo sea secundario al desgaste que sufren los pacientes con sida, máxime cuando solo unos pocos recibían la TARVAE (Mangili et al., 2006). Los análisis estadísticos permitieron demostrar la asociación entre los vómitos y el déficit motor con la neurocriptocosis en la cohorte de pacientes involucrados en este estudio. Este resultado sugiere que la presencia de estas manifestaciones debe incrementar el índice de sospecha clínica al momento de indicar los complementarios con vistas al diagnóstico precoz de la infección.

En general los parámetros hematológicos se consideran marcadores de gravedad o progresión en la mayoría de las enfermedades (Xu et al., 2013). En especial los niveles

de linfocitos T CD_4^+ y CD_8^+ se consideran la primera línea de defensa contra *Cryptococcus* (Eisenman et al., 2007). Al respecto, en la presente investigación, no fue posible arribar a conclusiones al respecto debido a que solo unos pocos pacientes contaban con esta determinación. Las restantes alteraciones hematológicas fueron consistentes con la anemia, la cual pudiera responder al síndrome de desgaste que suelen presentar estos pacientes, ya mencionado con anterioridad.

Como en la mayoría de las enfermedades infecciosas, la confirmación de la sospecha clínica de criptococosis se basa en los estudios microbiológicos que demuestran la presencia del agente causal. En la actualidad hay disponibles un gran número de herramientas que abarcan desde la visualización directa de las levaduras capsuladas en la muestra, hasta la detección de su ADN mediante métodos más complejos y costosos. Como una alternativa intermedia también existen sistemas comerciales de identificación que se utilizan con frecuencia en los laboratorios de micología. Cada uno de los métodos posee sus propias ventajas y limitaciones; conocerlos incrementa la posibilidad de interpretar correctamente sus resultados (bioMérieux SA, 2007; Firacative et al., 2012; Perfect y Bicanic, 2015; H. Wang, Yuan, y Zhang, 2015).

En el presente trabajo se combinaron varias herramientas de acuerdo a la factibilidad de su implementación *in situs*. Esto permitió constatar que el agente causal de la criptococosis en el grupo de pacientes estudiados fue la especie *C. neoformans*.

Los resultados discordantes entre el examen directo con tinta china y el cultivo en ADS en cinco de los pacientes pudieron estar determinados por la especificidad de cada método y a circunstancias no previstas durante la protocolización del estudio. Entre estas últimas, el consumo de sustancias diferentes de los antifúngicos comerciales y las condiciones de transporte de las muestras, los que pudieran comprometer la viabilidad de las levaduras. Estos aspectos deben tenerse en cuenta en investigaciones futuras.

La identificación bioquímica de *C. neoformans* a través del API[®] 20C AUX demostró ser eficaz. Su tasa de aciertos se incrementa al realizar pruebas auxiliares, como la formación de tubo germinativo, la filamentación en agar harina de maíz con Tween 80 y la hidrólisis de urea, entre otros (bioMérieux SA, 2007; Willemsen, Breynaert, y Lauwers, 1997). A pesar de esto, en seis aislados no se pudo obtener resultados concluyentes por este método, por lo que fueron sometidos a MALDI-TOF. Esta es una

técnica identificación microbiológica relativamente novedosa y promisoría cuya principal limitante está relacionada con el costo de las determinaciones, motivo por el cual no se hizo extensiva a los restantes aislados (Firacative et al., 2012).

De manera general, estos hallazgos demuestran que la neurocriptococosis constituye un problema importante de salud pública en Guayaquil. Su reconocimiento en la práctica clínica impone un gran reto, por cuanto no parece haber signos o síntomas patognomónicos. No obstante, la sobrevida de los pacientes depende del tratamiento oportuno por lo que i) esta micosis debe considerarse por las autoridades sanitarias para el desarrollo de programas de prevención y control basados en las evidencias existentes, ii) los clínicos que dan atención a los pacientes seropositivos al VIH deben elevar el índice de sospecha clínica y iii) esta sospecha debe confirmarse microbiológicamente.

¿Cuáles son las principales características microbiológicas de su agente causal?

A la luz de los conocimientos actuales se impone no solo la identificación del género del agente causal del proceso infeccioso, lo cual es aplicable a la criptococosis. En la práctica clínicoepidemiológica, la detección de una u otra especie y sus serotipos se traduce en el posible estado predisponente del hospedador y la fuente de infección; el tipo de apareamiento y el genotipo, en la capacidad patogénica, la gravedad de la infección y la posible respuesta al tratamiento antifúngico. De la misma forma, otros estudios moleculares permiten dilucidar la relación entre los aislados y de estos con los nichos ecológicos potenciales. En este contexto, los estudios de susceptibilidad *in vitro* merecen una mención especial pues hacen posible no solo el ajuste del tratamiento de cada paciente en particular, sino tomar decisiones empíricas basadas en la tendencia de los estudios previos. Todos estos factores redundan en el manejo de los pacientes y la toma de decisiones con relación a posibles fuentes de infección en cada caso. Bajo dichos conceptos se encaminaron los esfuerzos en la caracterización de los aislados recuperados de las muestras clínicas.

En el presente estudio todas las levaduras correspondieron con *C. neoformans* ser. A, apareamiento α , genotipo VGI. Este resultado es compatible con lo publicado en la literatura internacional (Arenas, 2014; Badali et al., 2015). Todas las evidencias apuntan a que este serotipo es el predominante en los pacientes seropositivos al VIH (condición de inclusión de los pacientes en el estudio) y el de más amplia distribución

mundial (Boulware et al., 2014; Cogliati, 2013; Perfect y Bicanic, 2015), por lo que los hallazgos en este sentido coincidieron con lo esperado. De forma eventual se describen en la literatura especializada infecciones por *C. gattii* en pacientes con sida, así como casos residentes en áreas no endémicas para esta especie. Esto último está asociado, bien a la adaptación de la levadura a nuevos ambientes, o a la adquisición de la infección durante la visita de los pacientes a zonas de mayor prevalencia de *C. gattii* (Byrnes et al., 2009; Hagen, van Assen, Luijckx, Boekhout, y Kampinga, 2010; Illnait-Zaragozi, Ortega-Gonzalez, Hagen, Martinez-Machin, y Meis, 2013).

En adición, los genotipos correspondientes a *C. gattii* suelen mostrar peor respuesta al tratamiento antifúngico (Espinel-Ingroff, Aller, et al., 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, et al., 2012). Estas circunstancias pudieran hacer pensar que la infección con *C. neoformans* es menos grave; sin embargo, el estado de inmunodepresión predisponente para la infección por esta levadura, pone en desventaja a estos pacientes (Worasilchai et al., 2016). A todo esto se añade las características de patogenicidad intrínsecas de cada aislado en particular y la cuantía del inóculo en el momento de la infección, los que de conjunto con el estado inmune del hospedador, determinan en última instancia la evolución del cuadro clínico (Perfect y Casadevall, 2002; Rajasingham et al., 2017).

Los múltiples ensayos clínicos en torno a la evaluación de estrategias terapéuticas en el manejo de los pacientes con criptococosis coinciden en el empleo de tres fases consistente en: el ataque inicial con anfotericina B y flucitosina, una segunda fase de consolidación con altas dosis de fluconazol y una de mantenimiento con este mismo medicamento durante períodos prolongados a dosis moderadas para evitar las recaídas (Worasilchai et al., 2016). Esta propuesta es consistente con los estudios multicéntricos de susceptibilidad *in vitro* de *Cryptococcus* frente a estos antifúngicos (Espinel-Ingroff, Aller, et al., 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, et al., 2012). No obstante, cada vez son más frecuentes los hallazgos de aislados resistentes especialmente a la flucitosina y al fluconazol, lo que justifica y perpetúa la evaluación *in vitro* de la susceptibilidad, así como la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas.

En este estudio todos los aislados mostraron susceptibilidad *in vitro* por los métodos empleados, tanto a la anfotericina B como a la flucitosina. Hasta el momento se

conocen muy pocas evidencias de aislados de *Cryptococcus* resistentes a la anfotericina B (Espinel-Ingroff, Aller, et al., 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, et al., 2012). Esto probablemente se deba a su acción fungicida sobre las levaduras asociado a su efecto inmunomodulador, con lo cual los resultados de esta investigación son consistentes con publicaciones anteriores (Cuenca-Estrella, 2010; Worasilchai et al., 2016).

Por su parte, la resistencia a la flucitosina, en especial cuando se usa en monoterapia, se encuentra bien documentada (Cuenca-Estrella, 2010; Espinel-Ingroff, Aller, et al., 2012; Espinel-Ingroff, Chowdhary, et al., 2012); sin embargo, esta pirimidina no se encuentra disponible en la actualidad en Ecuador y por ende, la posibilidad de desarrollar resistencia a la misma es muy pobre. Estas circunstancias brindan coherencia a los resultados de este trabajo.

Una situación diametralmente opuesta a la anterior se detectó para fluconazol. Este constituye el principal arsenal terapéutico en el tratamiento curativo y profiláctico de las micosis en el Hospital de Infectología de Guayaquil. En consonancia con este antecedente, 24/27 aislados mostraron resistencia *in vitro* lo que pudiera estar condicionado por el uso amplio que se hace de este medicamento. Así mismo, dada la naturaleza saprobiótica de *C. neoformans* también deber ser considerado el desarrollo de resistencia cruzada como consecuencia del empleo de azoles en la práctica agrícola (Kanafani y Perfect, 2008; May et al., 2016; Perfect et al., 2010; Perfect y Bicanic, 2015; Serfling et al., 2007).

Tanto la demostración del genotipo como del tipo de apareamiento y de la susceptibilidad *in vitro* de *C. neoformans* a través del presente estudio constituyen las primeras evidencias de estos particulares en Ecuador. De manera general, estas hacen proponer de una parte, que se replantee el esquema terapéutico de la criptococosis en esta unidad de salud y de otra, la necesidad de focalizar los posibles nichos de infección con vistas a su control. Encaminado a este último aspecto se desarrolló el siguiente paso de esta tesis.

¿La neurocriptocosis en los pacientes seropositivos al VIH estará relacionada con la presencia de su agente causal en los árboles aledaños al Hospital?

El complejo *C. neoformans/C. gattii* está integrado por levaduras saprobióticas de vida libre capaces de sobrevivir en diversos nichos ecológicos. No obstante, el mayor número de aislamientos de *C. neoformans* está relacionado con las excretas de aves, fundamentalmente de palomas (Kwon-Chung et al., 2011). Debido a que i) no se constató esta posible fuente de infección en el área seleccionada para el muestreo y ii) teniendo en cuenta la teoría de Lazera y cols., la cual sugiere que el hábitat primario de estas levaduras pudiera encontrarse en la vegetación y sus detritos sin que exista asociación con algún tipo de planta en particular (Lazera et al., 2000), así como iii) los resultados de trabajos previos (Chowdhary, Rhandhawa, Prakash, y Meis, 2012; Inait-Zaragozi et al., 2012; Randhawa et al., 2008), se decidió el muestreo de los árboles de los alrededores del hospital bajo el concepto de que este es un sitio común al que asisten los individuos susceptibles. De forma adicional, para este objetivo se utilizó la metodología que se describe en la literatura para el procesamiento y recuperación de esta levadura a partir de fuentes naturales (Randhawa et al., 2008, 2005). A pesar de todas estas consideraciones, los intentos por demostrar su presencia de esta levadura en los detritos de los árboles seleccionados fueron infructuosos.

Estos resultados pudieran obedecer a que la presencia de este hongo está gobernada por múltiples factores bióticos y abióticos. Entre los primeros destaca la competencia con otros microorganismos que pudieran estar presentes y, entre los segundos las características climatológicas y medioambientales como la exposición directa a la luz solar, el calor excesivo y la desecación por la acción del viento, fundamentalmente. Está ampliamente documentado que todas estas variables difieren de un nicho ambiental a otro (Randhawa et al., 2011). Corresponderá a estudios posteriores hacer una caracterización minuciosa de las condiciones del microclima en los alrededores del hospital y otras áreas de interés para determinar la posible fuente natural de *C. neoformans* en Guayaquil, Ecuador.

Aunque, como se menciona anteriormente, la metodología empleada para el muestreo y procesamiento de los detritos es la más usada y se encuentra respaldada por varios autores (Chowdhary et al., 2012; Colom et al., 2001), también existen resultados

contradictorios al respecto. En cuanto a estos últimos, las publicaciones sugieren que las técnicas convencionales necesitan el respaldo de herramientas moleculares. Esto es válido en especial cuando se trata de la identificación de *C. neoformans*/*C. gattii* a partir del primoaislamiento de muestras ambientales (Illnait-Zaragozi et al., 2012; Pedroso, da Costa, Ferreira, y Candido, 2007; Tay et al., 2008).

La ausencia de evidencias sobre la posible presencia de *C. neoformans* en áreas aledañas al hospital, amén de las consideraciones antes expuestas, debe estimular la búsqueda de su fuente potencial en otros sitios. Entre los más sugestivos se encuentran los relacionados con los domicilios y los lugares de trabajo de los pacientes, así como los palomares que pudieran ser identificados por colombófilos expertos de la ciudad.

Hoy, la caracterización a la máxima expresión posible, más que una aspiración, es una necesidad. En 1967, Pappagianis refiriéndose a *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). Desde entonces, la problemática impuesta por esta levadura motivó el desarrollo de un sinnúmero de investigaciones reveladoras; sin embargo, a la luz de estas se imponen nuevos retos aún por resolver. Después de 50 años, la frase no ha perdido vigencia y constituye un incentivo a continuar los estudios sobre *C. neoformans*, especie compleja que devino en complejo de especies y que a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, ocasiona grandes estragos, en especial en la población seropositiva al VIH.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Este constituye el primer estudio integral de la neurocriptococosis en Ecuador. El mismo aporta las primeras evidencias sobre las características microbiológicas de su agente causal en este país.

- Si bien la infección con el VIH y el síndrome neurológico asociado a este en los pacientes que asisten al Hospital de Infectología de Guayaquil muestran un comportamiento demográfico y clínicoepidemiológico en correspondencia con el descrito en el mundo, la prevalencia de la neurocriptococosis en este grupo es superior a otras notificaciones, lo que indica que la misma constituye un problema de salud en este contexto.
- La presentación inusual de la neurocriptococosis en este estudio alerta sobre la necesidad de elevar el nivel de sospecha clínica y la confirmación microbiológica de esta micosis en los pacientes seropositivos al VIH que acuden al Hospital de Infectología de Guayaquil.
- La identificación y caracterización de los aislados recuperados de las muestras clínicas coincide con los informes internacionales lo que ratifica que *C. neoformans* A α VNI es el principal agente causal de neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida.
- El elevado nivel de resistencia *in vitro* al fluconazol demostrado en este trabajo apunta a la necesidad de reevaluar los protocolos de tratamiento de la criptococosis en Guayaquil, así como de ampliar el alcance de este estudio al resto del país y mantener una vigilancia estrecha al respecto.
- El estudio de muestras ambientales no permitió evidenciar la presencia de *C. neoformans* en el entorno del Hospital de Infectología de Guayaquil, lo que indica la posible presencia de otras fuentes de infección por esta levadura en Guayaquil.

7. RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios de caracterización integral: clínicos, microbiológicos y medio-ambientales, acerca de este problema de salud en Ecuador.
- Profundizar los estudios de caracterización molecular de los aislados de *Cryptococcus* en Ecuador que aporten nuevos conocimientos sobre la epidemiología y mecanismos de resistencia de este microorganismo en este país y en Latinoamérica.
- Dar a conocer los resultados de este trabajo a las autoridades de salud de Ecuador e implementar en los laboratorios de Hospital de Infectología de Guayaquil las pruebas de referencia para estudios de susceptibilidad antifúngica *in vitro* que permitan confirmar los resultados hallados en este estudio.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

- Alspaugh, J. A. (2015). Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Cryptococcus: model basidiomycetes and deadly pathogens*, 78, 55-58. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.09.004>
- Alves, G. S. B., Freire, A. K. L., Bentes, A. D. S., Pinheiro, J. F. de S., de Souza, J. V. B., Wanke, B., ... Jackisch-Matsuura, A. B. (2016). Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. *Mycoses*, 59(8), 509-515. <https://doi.org/10.1111/myc.12499>
- Andes, D., Pascual, A., y Marchetti, O. (2009). Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 24-34. <https://doi.org/10.1128/AAC.00705-08>
- Antinori, S. (2013). New insights into HIV/AIDS-associated Cryptococcosis. *ISRN AIDS*, 2013, 471363. <https://doi.org/10.1155/2013/471363>
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Ishida-Okawara, A., ... Koyama, H. (2006). Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 9), 1291-1299. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46620-0>
- Arenas, R. (2014). *Micología médica ilustrada* (Cuarta). México: Mc Graw Hill.
- Armstrong-James, D., Meintjes, G., y Brown, G. D. (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in Microbiology*, 22(3), 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.001>

- Arvanitis, M., Anagnostou, T., Fuchs, B. B., Caliendo, A. M., y Mylonakis, E. (2014). Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 490-526. <https://doi.org/10.1128/CMR.00091-13>
- Azanza, J., y Barberán, J. (2012). Anfotericina B forma liposómica: un perfil farmacocinético exclusivo. Una historia inacabada. Recuperado a partir de <http://dadun.unav.edu/handle/10171/22324>
- Badali, H., Alian, S., Fakhim, H., Falahatinejad, M., Moradi, A., Mohammad Davoudi, M., ... Meis, J. F. (2015). Cryptococcal meningitis due to *Cryptococcus neoformans* genotype AFLP1/VNI in Iran: a review of the literature. *Mycoses*, 58(12), 689-693. <https://doi.org/10.1111/myc.12415>
- Bader, O., Weig, M., Taverne-Ghadwal, L., Lugert, R., Gross, U., y Kuhns, M. (2011). Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*, 17(9), 1359-1365. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x>
- Baradkar, V., Mathur, M., De, A., Kumar, S., y Rathi, M. (2009). Prevalence and clinical presentation of Cryptococcal meningitis among HIV seropositive patients. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases*, 30(1), 19-22. <https://doi.org/10.4103/0253-7184.55474>
- Barcia, V., y Sanchez, S. (2016). Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por *Cryptococcus* spp / Utility of indian ink as screening for meningitis by *Cryptococcus* spp. *Revista Ciencia Unemi*, 9(20), 63-7.
- Bejar, V., Tello, M., Garcia, R., Guevara, J. M., Gonzales, S., Vergaray, G., ... Gutierrez, E. L. (2015). Molecular characterization and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* strains collected from a single institution in Lima, Peru. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(2), 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.01.005>
- Bertout, S., Drakulovski, P., Kouanfack, C., Krasteva, D., Ngouana, T., Dunyach-Remy, C., ... Mallie, M. (2013). Genotyping and antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* isolates from Cameroonian HIV-positive adult patients. *Clinical Microbiology and Infection: The Official*

Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 19(8), 763-769. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12019>

- Bicmen, C., Doluca, M., Gulat, S., Gunduz, A. T., y Tuksavul, F. (2012). Species level identification and antifungal susceptibility of yeasts isolated from various clinical specimens and evaluation of Integral System Yeasts Plus. *The New Microbiologica, 35(3), 327-334.*
- bioMérieux SA. (2007). Api® 20 C AUX. Recuperado a partir de http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/API_20C_Aux.pdf
- Bolduc, P., Roder, N., Colgate, E., y Cheeseman, S. H. (2016). Care of patients with HIV infection: medical complications and comorbidities. *FP Essentials, 443, 16-22.*
- Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica* (Tercera). México: Mc Graw Hill.
- Boulware, D. R., Rolfes, M. A., Rajasingham, R., von Hohenberg, M., Qin, Z., Taseera, K., ... Meya, D. B. (2014). Multisite validation of cryptococcal antigen lateral flow assay and quantification by laser thermal contrast. *Emerging Infectious Diseases, 20(1), 45-53. <https://doi.org/10.3201/eid2001.130906>*
- Bovers, M., Hagen, F., y Boekhout, T. (2008). Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micología, 25(1), S4-12.*
- Bowen, L. N., Smith, B., Reich, D., Quezado, M., y Nath, A. (2016). HIV-associated opportunistic CNS infections: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews. Neurology, 12(11), 662-674. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.149>*
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., y White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine, 4(165), 165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>*
- Bruno, L., Laborde, G., Broli, F., Pérez, G., y Dufrechou, C. (2013). Vih-Sida: complicaciones neurológicas de los pacientes asistidos en un hospital general de adultos. *Archivos de Medicina Interna, 35(1), 5-8.*
- Byrnes, E. J. 3rd, Li, W., Lewit, Y., Perfect, J. R., Carter, D. A., Cox, G. M., y Heitman, J. (2009). First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an

- emerging pathogen. *PloS One*, 4(6), e5851.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005851>
- Carvalho, V. G., Terceti, M. S., Dias, A. L. T., Paula, C. R., Lyon, J. P., de Siqueira, A. M., y Franco, M. C. (2007). Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49(4), 207-210.
 - Casadevall, A., Freij, J. B., Hann-Soden, C., y Taylor, J. (2017). Continental Drift and Speciation of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes. *mSphere*, 2(2). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00103-17>
 - Catalan, M., y Montejo, J. C. (2006). Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Revista iberoamericana de micologia*, 23(1), 39-49.
 - Chaturvedi, V., y Chaturvedi, S. (2011). *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends in Microbiology*, 19(11), 564-571.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.010>
 - Chavez, J., Rivas, P., Cortés, J., Cuervo, S., Sánchez, R., y Parra, C. (2010). Sensibilidad in vitro de hongos miceliales de aislamientos clínicos en pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología ESE. *Infectio*, 14, 116-126.
 - Chayakulkeeree, M., y Perfect, J. R. (2006). Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 20(3), 507-544, v-vi.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2006.07.001>
 - Chen, M., Zhou, J., Li, J., Li, M., Sun, J., Fang, W. J., ... Pan, W. H. (2016). Evaluation of five conventional and molecular approaches for diagnosis of cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients. *Mycoses*, 59(8), 494-502.
<https://doi.org/10.1111/myc.12497>
 - Chiang, H., Tettamanti, D., y Castro, G. (2011). Tinta china en orina como método de diagnóstico en criptococosis diseminada asociado a VIH/SIDA. Estudio transversal realizado en el hospital de infectología «José Rodríguez M.» durante el año 2009. *Rev Med FCM-UCSG*, 16(2), 116–123.
 - Chipungu, C., Veltman, J. A., Jansen, P., Chiliko, P., Lossa, C., Namarika, D., ... Klausner, J. D. (2015). Feasibility and acceptability of Cryptococcal antigen screening and prevalence of cryptocococemia in patients attending a resource-limited HIV/AIDS Clinic in Malawi. *Journal of the International Association of*

- Providers of AIDS Care*, 14(5), 387-390.
<https://doi.org/10.1177/2325957415592475>
- Chowdhary, A., Randhawa, H. S., Sundar, G., Kathuria, S., Prakash, A., Khan, Z., ... Xu, J. (2011). In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 7), 961-967.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.029025-0>
 - Chowdhary, A., Rhandhawa, H. S., Prakash, A., y Meis, J. F. (2012). Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(1), 1-16.
<https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.606426>
 - CLSI. (2012). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard* (Cuarta). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
 - Cogliati, M. (2013). Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, 2013, 675213. <https://doi.org/10.1155/2013/675213>
 - Cogliati, M., D'Amicis, R., Zani, A., Montagna, M. T., Caggiano, G., De Giglio, O., ... Colom, M. F. (2016). Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Research*, 16(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow045>
 - Colom, M. F., Frases, S., Ferrer, C., Martín-Mazuelos, E., Hermoso-de-Mendoza, M., Torres-Rodríguez, J. M., y Quindós, G. (2001). Estudio epidemiológico de la criptococosis en España: primeros resultados. *Rev Iberoamer Micol*, 18, 99–104.
 - Colombo, A. C., y Rodrigues, M. L. (2015). Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 87(2 Suppl), 1293-1309.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140704>
 - Córdoba, S., Isla, M. G., Szusz, W., Vivot, W., Altamirano, R., y Davel, G. (2016). Susceptibility profile and epidemiological cut-off values of

- Cryptococcus neoformans* species complex from Argentina. *Mycoses*, 59(6), 351-356. <https://doi.org/10.1111/myc.12479>
- Cox, G., y Perfect, J. (2016). Treatment of *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis in HIV-infected patients. Recuperado a partir de <https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-cryptococcus-neoformans-meningoencephalitis-in-hiv-infected-patients>
 - Cuenca-Estrella, M. (2010). Antifungicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter*, 23(4), 169–176.
 - Cuenca-Estrella, M., y Rodriguez-Tudela, J. L. (2010). The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(3), 267-276. <https://doi.org/10.1586/eri.10.2>
 - Da Silva, B. K., Freire, A. K., Bentes, A. D. S., Sampaio, I. D. L., Santos, L. O., Dos Santos, M. S., y De Souza, J. V. (2012). Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 29(1), 40-43. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.05.003>
 - Day, J. N., Chau, T. T. H., y Laloo, D. G. (2013). Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *The New England Journal of Medicine*, 368(26), 2522-2523. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1305981>
 - Delgado, A. C. N., Taguchi, H., Mikami, Y., Myiajy, M., Villares, M., y Moretti, M. (2005). Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia*, 159(1), 7-11. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-9618-4>
 - Diamond, R. D., y Bennett, J. E. (1974). Prognostic factors in cryptococcal meningitis. A study in 111 cases. *Annals of Internal Medicine*, 80(2), 176-181.
 - Eisenman, H. C., Casadevall, A., y McClelland, E. E. (2007). New insights on the pathogenesis of invasive *Cryptococcus neoformans* infection. *Current Infectious Disease Reports*, 9(6), 457-464.
 - Elhariri, M., Hamza, D., Elhelw, R., y Refai, M. (2016). Eucalyptus Tree: A Potential Source of *Cryptococcus neoformans* in Egyptian Environment.

International Journal of Microbiology, 2016, 4080725.
<https://doi.org/10.1155/2016/4080725>

- Escandón, P., y Montilla, A. (2010). Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. *Infectio*, 14, 127-130.
[https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70130-2](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70130-2)
- Espinel-Ingroff, A., Aller, A. I., Canton, E., Castanon-Olivares, L. R., Chowdhary, A., Cordoba, S., ... Turnidge, J. (2012). *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5898-5906. <https://doi.org/10.1128/AAC.01115-12>
- Espinel-Ingroff, A., Chowdhary, A., Cuenca-Estrella, M., Fothergill, A., Fuller, J., Hagen, F., ... Turnidge, J. (2012). *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3107-3113.
<https://doi.org/10.1128/AAC.06252-11>
- Fera, M. T., La Camera, E., y De Sarro, A. (2009). New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(8), 981-998.
<https://doi.org/10.1586/eri.09.67>
- Fernández, C., Martínez, G., González, M., y Pimentel, T. (1999). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a *Cryptococcus neoformans*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 51(1), 55-57.
- Fernández, M. (2007). *Sobre el impacto económico del VIH/SIDA en el Ecuador*.
- Firacative, C., Roe, C. C., Malik, R., Ferreira-Paim, K., Escandon, P., Sykes, J. E., ... Meyer, W. (2016). MLST and Whole-Genome-Based Population Analysis of *Cryptococcus gattii* VGIII Links Clinical, Veterinary and Environmental Strains, and Reveals Divergent Serotype Specific Subpopulations and Distant Ancestors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004861. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004861>

- Firacative, C., Trilles, L., y Meyer, W. (2012). MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PloS One*, 7(5), e37566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037566>
- Fonseca, A., Boekhout, T., y Fell, J. (2011). *The yeasts: a taxonomic study. In Cryptococcus*. Amsterdam: Elsevier Science & Technology.
- Fu, C., Sun, S., Billmyre, R. B., Roach, K. C., y Heitman, J. (2015). Unisexual versus bisexual mating in *Cryptococcus neoformans*: Consequences and biological impacts. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 78, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.008>
- García, J., y Novoa, A. (2011). Criptococosis. Una amenaza para pacientes inmunodeprimidos. *Gaceta Médica Espirituana*, 13(3), 15-7.
- Gordon, M. A., y Vedder, D. K. (1966). Serologic tests in diagnosis and prognosis of cryptococcosis. *JAMA*, 197(12), 961-967.
- Graciele-Melo, C., Rocha-Silva, F., Christo Paulo, P., y Caligiorme Rachel, B. (2016). Use of Polymerase chain Reaction for *Cryptococcus neoformans* Genome Detection in Cerebrospinal Fluid for Neurocryptococcosis Diagnosis. *Medical Mycology: Open Access*, 2(8), 1-7. <https://doi.org/doi: 10.4172/2471-8521.100013>
- Gray, L. D., y Fedorko, D. P. (1992). Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(2), 130-145.
- Guevara, M., Urcia, F., y Casquero, J. (2007). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. *Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud*.
- Guinea, J., y Bouza, E. (2008). Isavuconazole: a new and promising antifungal triazole for the treatment of invasive fungal infections. *Future Microbiology*, 3(6), 603-615. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.6.603>
- Guinea, J., Hagen, F., Pelaez, T., Boekhout, T., Tahoune, H., Torres-Narbona, M., y Bouza, E. (2010). Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain. *Medical Mycology*, 48(7), 942-948. <https://doi.org/10.3109/13693781003690067>

- Hagen, F., Ceresini, P. C., Polacheck, I., Ma, H., van Nieuwerburgh, F., Gabaldon, T., ... Boekhout, T. (2013). Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. *PloS One*, 8(8), e71148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071148>
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., ... Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, 78, 16-48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>
- Hagen, F., van Assen, S., Luijckx, G. J., Boekhout, T., y Kampinga, G. A. (2010). Activated dormant *Cryptococcus gattii* infection in a Dutch tourist who visited Vancouver Island (Canada): a molecular epidemiological approach. *Medical Mycology*, 48(3), 528-531. <https://doi.org/10.3109/13693780903300319>
- Hansen, J., Slechta, E. S., Gates-Hollingsworth, M. A., Neary, B., Barker, A. P., Bauman, S., ... Hanson, K. E. (2013). Large-scale evaluation of the immunomycology lateral flow and enzyme-linked immunoassays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 20(1), 52-55. <https://doi.org/10.1128/CVI.00536-12>
- Hasimoto e Souza, L. K., Costa, C. R., Fernandes, O. de F. L., Abrao, F. Y., Silva, T. C., Tremea, C. M., y Silva, M. do R. R. (2013). Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(3), 343-347. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0061-2012>
- Hettick, J. M., Green, B. J., Buskirk, A. D., Kashon, M. L., Slaven, J. E., Janotka, E., ... Beezhold, D. H. (2008). Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Biochemistry*, 380(2), 276-281. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.051>
- Holikatti, P. C., y Kar, N. (2012). Psychiatric Manifestations in a Patient with HIV-Associated Neurocognitive Symptoms and Cryptococcal Meningitis. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 34(4), 381-382. <https://doi.org/10.4103/0253-7176.108226>

- Huang, A. M., Newton, D., Kunapuli, A., Gandhi, T. N., Washer, L. L., Isip, J., ... Nagel, J. L. (2013). Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(9), 1237-1245. <https://doi.org/10.1093/cid/cit498>
- Hubalek, Z. (2003). Emerging human infectious diseases: anthroponoses, zoonoses, and sapronoses. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 403-404. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020208>
- Hurd, Y. L., Suzuki, M., y Sedvall, G. C. (2001). D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 22(1-2), 127-137.
- Huston, S. M., y Mody, C. H. (2009). Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clinics in Chest Medicine*, 30(2), 253-264, vi. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.006>
- Igreja, R. P., Lazera, M. D. S., Wanke, B., Galhardo, M. C. G., Kidd, S. E., y Meyer, W. (2004). Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. *Medical Mycology*, 42(3), 229-238.
- Illnait-Zaragozi, M., Hagen, F., Fernandez-Andreu, C. M., Martinez-Machin, G. F., Polo-Leal, J. L., Boekhout, T., ... Meis, J. F. (2011). Reactivation of a *Cryptococcus gattii* infection in a cheetah (*Acinonyx jubatus*) held in the National Zoo, Havana, Cuba. *Mycoses*, 54(6), e889-892. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02046.x>
- Illnait-Zaragozi, M., Martinez-Machin, G. F., Fernandez-Andreu, C. M., Perurena-Lancha, M. R., Theelen, B., Boekhout, T., ... Klaassen, C. H. (2012). Environmental isolation and characterisation of *Cryptococcus* species from living trees in Havana city, Cuba. *Mycoses*, 55(3), e138-144. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02168.x>
- Illnait-Zaragozi, M. T., Martinez-Machin, G. F., Fernandez-Andreu, C. M., Perurena-Lancha, M. R., Hagen, F., y Meis, J. F. (2014). *Cryptococcus* and cryptococcosis in Cuba. A minireview. *Mycoses*, 57(12), 707-717. <https://doi.org/10.1111/myc.12275>

- Illnait-Zaragozi, M. T., Ortega-Gonzalez, L. M., Hagen, F., Martinez-Machin, G. F., y Meis, J. F. (2013). Fatal *Cryptococcus gattii* genotype AFLP5 infection in an immunocompetent Cuban patient. *Medical Mycology Case Reports*, 2, 48-51. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2013.02.001>
- Illnait-Zaragozi, Martinez-Machin, G., Fernandez-Andreu, C., Boekhout, T., Meis, J. F., y Klaassen, C. H. W. (2010). Microsatellite typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. *PloS One*, 5(2), e9124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009124>
- INEC. (2012). *Clasificación Nacional de Actividades Económicas* (No. CIIU Rev 4.0) (p. 44). Ecuador: Instituto Nacional de Estadísticas y censos.
- Iriart, X., Lavergne, R.-A., Fillaux, J., Valentin, A., Magnaval, J.-F., Berry, A., y Cassaing, S. (2012). Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 2107-2110. <https://doi.org/10.1128/JCM.06713-11>
- Jain, N., Wickes, B. L., Keller, S. M., Fu, J., Casadevall, A., Jain, P., ... Fries, B. C. (2005). Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5733-5742. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5733-5742.2005>
- Jaiswal, S. P. B., Hemwani, N., Sharma, N., Athale, S., y Chitnis, D. S. (2002). Prevalence of fungal meningitis among HIV positive & negative subjects in Indore (MP state). *Indian Journal of Medical Sciences*, 56(7), 325-329.
- Jarrín, K., Cordovez, M., y Vera, E. (2012). Criptococomas cerebrales en un paciente inmunocompetente: Reporte de un caso, 2(1), 23-33.
- Jarvis, J. N., Meintjes, G., Bicanic, T., Buffa, V., Hogan, L., Mo, S., ... Harrison, T. S. (2015). Cerebrospinal fluid cytokine profiles predict risk of early mortality and immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-associated cryptococcal meningitis. *PLoS Pathogens*, 11(4), e1004754. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004754>
- Johnson, E. M. (2008). Issues in antifungal susceptibility testing. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 Suppl 1, i13-18. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm427>

- Kammalac Ngouana, T., Drakulovski, P., Krasteva, D., Kouanfack, C., Reynes, J., Delaporte, E., ... Bertout, S. (2016). *Cryptococcus neoformans* isolates from Yaounde human immunodeficiency virus-infected patients exhibited intra-individual genetic diversity and variation in antifungal susceptibility profiles between isolates from the same patient. *Journal of Medical Microbiology*, 65(7), 579-589. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000265>
- Kanafani, Z. A., y Perfect, J. R. (2008). Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(1), 120-128. <https://doi.org/10.1086/524071>
- Kasper, D., y Fauci, A. (2012). *Harrison's Infectious Diseases* (Décimo octava). New York: Mc Graw Hill. Recuperado a partir de <https://harrisonmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=865>
- Kawakami, K., Qifeng, X., Tohyama, M., Qureshi, M. H., y Saito, A. (1996). Contribution of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in host defence mechanism against *Cryptococcus neoformans*. *Clinical and Experimental Immunology*, 106(3), 468-474.
- Khawcharoenporn, T., Apisarnthanarak, A., Kiratisin, P., Mundy, L. M., y Bailey, T. C. (2006). Evaluation of *Cryptococcus laurentii* meningitis in a patient with HIV infection: a case report and review of the literature. *Hawaii Medical Journal*, 65(9), 260-263.
- Kidd, S. E., Chow, Y., Mak, S., Bach, P. J., Chen, H., Hingston, A. O., ... Bartlett, K. H. (2007). Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1433-1443. <https://doi.org/10.1128/AEM.01330-06>
- Koneman, E. W., y Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas*. Médica Panamericana. Recuperado a partir de <https://books.google.com.uy/books?id=jyVQueKro88C>
- Kozel, T. R., y Bauman, S. K. (2012). CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 6(3), 245-251. <https://doi.org/10.1517/17530059.2012.681300>

- Kozubowski, L., y Heitman, J. (2012). Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 78-94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00286.x>
- Krangvichain, P., Niyomtham, W., y Prapasarakul, N. (2016). Occurrence and susceptibilities to disinfectants of *Cryptococcus neoformans* in fecal droppings from pigeons in Bangkok, Thailand. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(3), 391-396. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0594>
- Kumar, S., Wanchu, A., Chakrabarti, A., Sharma, A., Bambery, P., y Singh, S. (2008). Cryptococcal meningitis in HIV infected: experience from a North Indian tertiary center. *Neurology India*, 56(4), 444-449.
- Kwon-Chung, K. J., Boekhout, T., Wickes, B. L., y Fell, J. W. (2011). Systematics of the Genus *Cryptococcus* and Its Type Species *C. neoformans*. En *Cryptococcus*. Washington, DC: AMS Press. Recuperado a partir de <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816858.ch01>
- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I., y Bennett, J. E. (1982). Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology*, 15(3), 535-537.
- La Hoz, R. M., y Pappas, P. G. (2013). Cryptococcal infections: changing epidemiology and implications for therapy. *Drugs*, 73(6), 495-504. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0037-z>
- Lakshmi, V., Sudha, T., Teja, V. D., y Umabala, P. (2007). Prevalence of central nervous system cryptococcosis in human immunodeficiency virus reactive hospitalized patients. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25(2), 146-149.
- Lazera, M. S., Salmito Cavalcanti, M. A., Londero, A. T., Trilles, L., Nishikawa, M. M., y Wanke, B. (2000). Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, 38(5), 379-383.
- Leaw, S. N., Chang, H. C., Sun, H. F., Barton, R., Bouchara, J.-P., y Chang, T. C. (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 693-699. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.693-699.2006>

- Lee, S. C., Dickson, D. W., y Casadevall, A. (1996). Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications. *Human Pathology*, 27(8), 839-847.
- Lewis, R. E., Viale, P., y Kontoyiannis, D. P. (2012). The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. *Virulence*, 3(4), 368-376. <https://doi.org/10.4161/viru.20746>
- Li, A.-S., Pan, W.-H., Wu, S.-X., Hideaki, T., Guo, N.-R., Shen, Y.-N., ... Liao, W.-Q. (2012). Ecological surveys of the *Cryptococcus* species complex in China. *Chinese Medical Journal*, 125(3), 511-516.
- Lin, X., y Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, 60, 69-105. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>
- Litvintseva, A. P., Thakur, R., Vilgalys, R., y Mitchell, T. G. (2006). Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*, 172(4), 2223-2238. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.046672>
- Lizarazo, J., Linares, M., de Bedout, C., Restrepo, Á., Agudelo, C. I., y Castañeda, E. (2007). Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica*, 27(1), 94-109. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.236>
- López, P. (2002). Criptococosis del Sistema Nervioso Central. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 3(1), 34-6.
- Lugmaña, G. (2014). Anuario de Estadísticas Hospitalarias: Egresos y Camas 2014. Recuperado a partir de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/Camas_Egresos_Hospitalarios/Publicaciones-Cam_Egre_Host/Anuario_Camas_Egresos_Hospitalarios_2014.pdf
- Magee, P. T., Gale, C., Berman, J., y Davis, D. (2003). Molecular Genetic and Genomic Approaches to the Study of Medically Important Fungi. *Infection and Immunity*, 71(5), 2299-2309.

- Makadzange, A. T., y McHugh, G. (2014). New approaches to the diagnosis and treatment of cryptococcal meningitis. *Seminars in Neurology*, 34(1), 47-60. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1372342>
- Malkmus, G. (2006). *Manual de bioseguridad en el laboratorio* (Tercera). Ginebra: OMS. Recuperado a partir de http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
- Mangili, A., Murman, D. H., Zampini, A. M., y Wanke, C. A. (2006). Nutrition and HIV infection: review of weight loss and wasting in the era of highly active antiretroviral therapy from the nutrition for healthy living cohort. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(6), 836-842. <https://doi.org/10.1086/500398>
- Manosuthi, W., Sungkanuparph, S., Thongyen, S., Chumpathat, N., Eampokalap, B., Thawornwan, U., y Foongladda, S. (2006). Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates and clinical outcomes of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients with/without fluconazole prophylaxis. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*, 89(6), 795-802.
- Marcos, J. Y., y Pincus, D. H. (2013). Fungal diagnostics: review of commercially available methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 968, 25-54. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-257-5_2
- Marquis, G., Montplaisir, S., Pelletier, M., Mousseau, S., y Auger, P. (1985). Genetic resistance to murine cryptococcosis: increased susceptibility in the CBA/N XID mutant strain of mice. *Infection and Immunity*, 47(1), 282-287.
- Matsumoto, M. T., Fusco-Almeida, A. M., Baeza, L. C., Melhem, M. de S. C., y Medes-Giannini, M. J. S. (2007). Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Sao Paulo State, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49(1), 41-47.
- May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T., y Nielsen, K. (2016). *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(2), 106-117. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>
- Maziarz, E. K., y Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 179-206. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>

- Mazuelos, E. M., y Garcia, A. I. A. (2010). Microbiological aspects of the cryptococcosis in the post-HAART era. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, 28 Suppl 1, 40-45. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70007-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70007-0)
- McTaggart, L., Richardson, S. E., Seah, C., Hoang, L., Fothergill, A., y Zhang, S. X. (2011). Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2522-2527. <https://doi.org/10.1128/JCM.00502-11>
- Mdodo, R., Moser, S. A., Jaoko, W., Baddley, J., Pappas, P., Kempf, M.-C., ... Jolly, P. (2011). Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates from AIDS patients in Kenya. *Mycoses*, 54(5), e438-442. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01946.x>
- Messina, F. A., Negroni, R., Maiolo, E. I., Arechavala, A., Villafane, M. F., Santiso, G., ... Corti, M. (2014). Cryptococcal meningitis in patients with diabetes and AIDS. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, 32(10), 643-646. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.001>
- Metin, B., Findley, K., y Heitman, J. (2010). 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 Genetics*, 6(5), e1000961. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000961>
- Meya, D., Rajasingham, R., Nalintya, E., Tenforde, M., y Jarvis, J. N. (2015). Preventing cryptococcosis-shifting the paradigm in the era of highly active antiretroviral therapy. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(2), 81-89. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0045-z>
- Meyer, W., Castaneda, A., Jackson, S., Huynh, M., y Castaneda, E. (2003). Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 9(2), 189-195. <https://doi.org/10.3201/eid0902.020246>
- Meyer, W., y Trilles, L. (2010). Genotyping of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Showcase on Research*, 41(1), 11-6.
- Miyazato, A. (2016). Mechanism of *Cryptococcus* meningoencephalitis. *Medical mycology journal*, 57(1), J27-32. <https://doi.org/10.3314/mmj.57.J27>

- Mlinaric-Missoni, E., Hagen, F., Chew, W. H. M., Vazic-Babic, V., Boekhout, T., y Begovac, J. (2011). In vitro antifungal susceptibilities and molecular typing of sequentially isolated clinical *Cryptococcus neoformans* strains from Croatia. *Journal of Medical Microbiology*, 60(10), 1487-1495. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.031344-0>
- Moen, T., Agresti, J. J., Cnaani, A., Moses, H., Famula, T. R., Hulata, G., ... May, B. (2004). A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. *Aquaculture Research*, 35(9), 893-904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01082.x>
- Moghnieh, R., El-Rajab, N., Abdallah, D. I., Fawaz, I., Mugharbil, A., Jisr, T., y Ibrahim, A. (2015). Retrospective Analysis on the Use of Amphotericin B Lipid Complex in Neutropenic Cancer Patients with Suspected Fungal Infections in Lebanon, a Single Center Experience and Review of International Guidelines. *Frontiers in Medicine*, 2, 92. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00092>
- Montaña, K., Villalpando, E., y Vargas, F. (2006). AFLP (amplified fragment length polymorphism) y su aplicación en acuicultura. *Interciencia*, 31(8), 563-9.
- MSP. (2011). Análisis de la situación del VIH en el Ecuador 2010. Recuperado a partir de <https://instituciones.msp.gob.ec>
- Mwaba, P., Mwansa, J., Chintu, C., Pobee, J., Scarborough, M., Portsmouth, S., y Zumla, A. (2001). Clinical presentation, natural history, and cumulative death rates of 230 adults with primary cryptococcal meningitis in Zambian AIDS patients treated under local conditions. *Postgraduate Medical Journal*, 77(914), 769-773.
- Nnadi, N. E., Enweani, I. B., Cogliati, M., Ayanbimpe, G. M., Okolo, M. O., Kim, E., ... Scordino, F. (2016). Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* VNII isolates in Jos, Plateau State, Nigeria. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 26(4), 306-311. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.04.001>
- Nosanchuk, J. D., Rosas, A. L., Lee, S. C., y Casadevall, A. (2000). Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. *Lancet (London, England)*, 355(9220), 2049-2050. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02356-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02356-4)

- OMS. (2014). Estadísticas sanitarias mundiales 2014. Recuperado a partir de www.who.int
- ONU. (2005). Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Recuperado a partir de <http://www.unesco.org/new/es/unesco>
- Ordoñez, C., Arias, J., y Parra, J. (2013). Linfadenitis criptocócica. *Revista Médica HJCA*, 5(1), 79-83.
- Park, S. H., Kim, M., Joo, S. I., y Hwang, S. M. (2014). Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* Isolates in Seoul, Korea. *Mycobiology*, 42(1), 73-78. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.73>
- Park, Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., y Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS (London, England)*, 23(4), 525-530. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328322ffac>
- Paúl, S. C. D., y Cardona, N. (2008). Criptococosis en pacientes con SIDA: manifestaciones cutáneas y sistémicas, diagnóstico y terapéutica. *CES Medicina*, 22(1), 79–88.
- Paz, M. T. (2014). Neurocriptococosis crónica en un paciente inmunocompetente. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 18(6), 1133-1139.
- Pedroso, R. dos S., da Costa, K. R. C., Ferreira, J. C., y Candido, R. C. (2007). Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(5), 566-568.
- Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., y Calvo, M. C. R. (2001). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Revista Iberoamericana de Micología. Recuperado a partir de <https://books.google.com.ec/books?id=k9caAAAACAAJ>
- Pemán, Martín Mazuelos, y Rubio Calvo. (2007). *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica* (2da ed.). Revista Iberoamericana de Micología.
- Perez, C., Dolande, M., Moya, M., Rosello, A., de Capriles, C. R. H., Landaeta, M. E., y Mata-Essayag, S. (2008). *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus*

- gattii*: serotypes in Venezuela. *Mycopathologia*, 166(3), 149-153. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9132-1>
- Perfect, J. R., y Bicanic, T. (2015). Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 78, 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.003>
 - Perfect, J. R., y Casadevall, A. (2002). Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 16(4), 837-874, v-vi.
 - Perfect, J. R., Dismukes, W. E., Dromer, F., Goldman, D. L., Graybill, J. R., Hamill, R. J., ... Sorrell, T. C. (2010). Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 50(3), 291-322. <https://doi.org/10.1086/649858>
 - Petrou, M. A., y Shanson, D. C. (2000). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* by the NCCLS microdilution and Etest methods using five defined media. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(5), 815-818.
 - Phadke, S. S., Feretzaki, M., y Heitman, J. (2013). Unisexual reproduction enhances fungal competitiveness by promoting habitat exploration via hyphal growth and sporulation. *Eukaryotic Cell*, 12(8), 1155-1159. <https://doi.org/10.1128/EC.00147-13>
 - Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., ... Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
 - Ramírez, E. (2008). *Estudio de los factores de patogenicidad de Cryptococcus gattii* (doctoral). Universidad Autonoma de Barcelona, España. Recuperado a partir de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3921/evr1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 - Randhawa, H. S., Kowshik, T., Chowdhary, A., Prakash, A., Khan, Z. U., y Xu, J. (2011). 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. *Medical Mycology*, 49(3), 320-323. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.516457>

- Randhawa, H. S., Kowshik, T., Chowdhary, A., Preeti Sinha, K., Khan, Z. U., Sun, S., y Xu, J. (2008). The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Medical Mycology*, 46(8), 823-833. <https://doi.org/10.1080/13693780802124026>
- Randhawa, H. S., Kowshik, T., y Khan, Z. U. (2005). Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. *Medical Mycology*, 43(1), 67-71.
- Refojo, N., Perrotta, D., Brudny, M., Abrantes, R., Hevia, A. I., y Davel, G. (2009). Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Medical Mycology*, 47(2), 177-184. <https://doi.org/10.1080/13693780802227290>
- Reichert-Lima, F., Busso-Lopes, A. F., Lyra, L., Peron, I. H., Taguchi, H., Mikami, Y., ... Schreiber, A. Z. (2016). Evaluation of antifungal combination against *Cryptococcus* spp. *Mycoses*, 59(9), 585-593. <https://doi.org/10.1111/myc.12510>
- Reolon, A., Perez, L. R. R., y Mezzari, A. (2004). Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 40(5), 293-298.
- Rhodes, J., Desjardins, C. A., Sykes, S. M., Beale, M. A., Vanhove, M., Sakthikumar, S., ... Cuomo, C. A. (2017). Tracing Genetic Exchange and Biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the Global Population Level. *Genetics*, 207(1), 327-346. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.203836>
- Rodriguez, J., Arendrup, M., Arikan, S., Barchiesi, F., Bille, J., y Cryssanthou, E. (2008). EUCAST definitive document E. DEF 9.1: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Recuperado a partir de https://www.researchgate.net/profile/Maiken_Cavling_Arendrup/publication/242279976_EUCAST_DEFINITIVE_DOCUMENT_EDEF_91_Method_for_the_determination_of_broth_dilution_minimum_inhibitory_concentrations_of_antifung

- Ruane, P. J., Walker, L. J., y George, W. L. (1988). Disseminated infection caused by urease-negative *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(10), 2224-2225.
- Ruiz-Camps, I., y Cuenca-Estrella, M. (2009). Antifungals for systemic use. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(6), 353-362. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.04.001>
- Sánchez, A., Escandón, P., y Castañeda, E. (2008). Determinación in vitro de la actividad de los factores asociados con la virulencia de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(3), 145-149. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70034-2](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70034-2)
- Satishchandra, P., Mathew, T., Gadre, G., Nagarathna, S., Chandramukhi, A., Mahadevan, A., y Shankar, S. K. (2007). Cryptococcal meningitis: clinical, diagnostic and therapeutic overviews. *Neurology India*, 55(3), 226-232.
- Schmiedel, Y., y Zimmerli, S. (2016). Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Medical Weekly*, 146, w14281. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14281>
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J. M., y Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(4), 543-551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Serfling, A., Wohlrab, J., y Deising, H. B. (2007). Treatment of a clinically relevant plant-pathogenic fungus with an agricultural azole causes cross-resistance to medical azoles and potentiates caspofungin efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3672-3676. <https://doi.org/10.1128/AAC.00654-07>
- Sharma, G., Oberoi, S.-S., Vohra, P., y Nagpal, A. (2015). Oral manifestations of HIV/AIDS in Asia: Systematic review and future research guidelines. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 7(3), e419-427. <https://doi.org/10.4317/jced.52127>

- Shelburne, S. A. 3rd, Darcourt, J., White, A. C. J., Greenberg, S. B., Hamill, R. J., Atmar, R. L., y Visnegarwala, F. (2005). The role of immune reconstitution inflammatory syndrome in AIDS-related *Cryptococcus neoformans* disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(7), 1049-1052. <https://doi.org/10.1086/428618>
- Shin, J. H., Ranken, R., Sefers, S. E., Lovari, R., Quinn, C. D., Meng, S., ... Tang, Y.-W. (2013). Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 136-141. <https://doi.org/10.1128/JCM.01907-12>
- Sidrim, J. J. C., Costa, A. K. F., Cordeiro, R. A., Brilhante, R. S. N., Moura, F. E. A., Castelo-Branco, D. S. C. M., ... Rocha, M. F. G. (2010). Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(6), 445-458. <https://doi.org/10.1139/w10-030>
- Silva, P. R. da, Rabelo, R. A. de S., Terra, A. P. S., y Teixeira, D. N. S. (2008). Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(2), 158-162.
- Smith, J., y Andes, D. (2008). Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Therapeutic Drug Monitoring*, 30(2), 167-172. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318167d0e0>
- Spina-Tensini, T., Muro, M. D., Queiroz-Telles, F., Strozzi, I., Moraes, S. T., Petterle, R. R., ... de Almeida, S. M. (2017). Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. *Mycoses*, 60(1), 51-58. <https://doi.org/10.1111/myc.12550>
- Stone, N. R. H., Bicanic, T., Salim, R., y Hope, W. (2016). Liposomal Amphotericin B (AmBisome((R))): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. *Drugs*, 76(4), 485-500. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0538-7>

- Sun, S., y Heitman, J. (2015). From Two to One: Unipolar Sexual Reproduction. *Fungal Biology Reviews*, 29(3-4), 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.06.002>
- Suryawanshi, R. S., Koticha, A. H., y Rajiv, P. (2012). *Cryptococcus neoformans*: Is Variety Differentiation Necessary? *Bombay Hospital Journal*, 54(1), 58-62.
- Sykes, J. E., Hodge, G., Singapuri, A., Yang, M. L., Gelli, A., y Thompson, G. R. 3rd. (2017). In vivo development of fluconazole resistance in serial *Cryptococcus gattii* isolates from a cat. *Medical Mycology*, 55(4), 396-401. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw104>
- Tangwattanachuleeporn, M., Somparn, P., Poolpol, K., Gross, U., Weig, M., y Bader, O. (2013). Prevalence and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon excreta in Chon Buri Province, Eastern Thailand. *Medical Mycology Journal*, 54(3), 303-307.
- Tapia, C. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista chilena de infectología*, 26(2), 144-150.
- Tapia, C., León, E., y Palavecino, E. (2003). Susceptibilidad antifúngica de levaduras mediante Etest ®: Comparación de 3 medios. *Revista médica de Chile*, 131(3), 299-302.
- Tay, S. T., Na, S. L., y Tajuddin, T. H. (2008). Natural occurrence and growth reaction on canavanine-glycine-bromothymol blue agar of non-neoformans *Cryptococcus* spp. in Malaysia. *Mycoses*, 51(6), 515-519. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01516.x>
- Taylor-Smith, L. M., y May, R. C. (2016). New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.018>
- Tenforde, M. W., Wake, R., Leeme, T., y Jarvis, J. N. (2016). HIV-associated Cryptococcal meningitis: bridging the gap between developed and resource-limited settings. *Current Clinical Microbiology Reports*, 3, 92-102. <https://doi.org/10.1007/s40588-016-0035-5>
- Thompson. (2002). Antifúngicos. *Revista chilena de infectología*, 19(1), 22-25.
- Thompson, G. R. 3rd, Fothergill, A. W., Wiederhold, N. P., Vallor, A. C., Wickes, B. L., y Patterson, T. F. (2008). Evaluation of Etest method for

- determining isavuconazole MICs against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2959-2961. <https://doi.org/10.1128/AAC.00646-08>
- Tintelnot, K., Hagen, F., Han, C. O., Seibold, M., Rickerts, V., y Boekhout, T. (2015). Pitfalls in Serological Diagnosis of *Cryptococcus gattii* Infections. *Medical Mycology*, 53(8), 874-879. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv061>
 - Tircio, S., y Vallejo, V. (2014). *Determinación de criptococosis en pacientes con VIH. Factores de riesgo y complicaciones en el Hospital de Infectología« Dr. Jose Daniel Rodriguez Maridueña» en el periodo 2013-2014.* (Pre-grado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. Recuperado a partir de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/10998>
 - Trilles, L., Wang, B., Firacative, C., Lazera, M. D. S., Wanke, B., y Meyer, W. (2014). Identification of the major molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* by Hyperbranched rolling circle amplification. *PloS One*, 9(4), e94648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094648>
 - Tsuji, O., Barbabosa, I., y Rivera, T. (2005). Criptococosis. Historia natural y estado actual del tratamiento. *Acta Pediátrica de México*, 26(1), 18-28.
 - Turnidge, J., Kahlmeter, G., y Kronvall, G. (2006). Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(5), 418-425. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x>
 - Usiña, J., y Carrera, S. (2013). Anuario de la Estadística Recursos y Actividades de Salud 2013. Recuperado a partir de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Nacimientos_Defunciones/Publicaciones/Anuario_Nacimientos_y_Defunciones_2013.pdf
 - Valarezo, J. (2008). *Aislamiento de Cryptococcus neoformans var. neoformans a partir de excretas de palomas en la ciudad de Machala.* (Pre-grado). Universidad Técnica de Macjala, Machala, Ecuador. Recuperado a partir de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1088>

- Vance, C., Malo, M., Armas, N., Rodríguez, N., Tobar, R., y Solano, G. (2016). Guía de atención integral para adultos y adolescentes con infección VIH/SIDA. Recuperado a partir de Guía de atención integral para adultos y adolescentes con infección VIH/SIDA
- Varma, A., y Kwon-Chung, K. J. (2010). Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2303-2311. <https://doi.org/10.1128/AAC.00153-10>
- Vidal, J. E., y Boulware, D. R. (2015). Lateral flow assay for Cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57(19), 38-45. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700008>
- Vidotto, V., Aoki, S., Ponton, J., Quindos, G., Koga-Ito, C. Y., y Pugliese, A. (2004). A new caffeic acid minimal synthetic medium for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21(2), 87-89.
- Wade, R. L., Chaudhari, P., Natoli, J. L., Taylor, R. J., Nathanson, B. H., y Horn, D. L. (2013). Nephrotoxicity and other adverse events among inpatients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(3), 361-367. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.001>
- Wang, H., Yuan, X., y Zhang, L. (2015). Latex agglutination: diagnose the early *Cryptococcus neoformans* test of capsular polysaccharide antigen. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1 Suppl), 307-311.
- Wang, R., Chen, Y., Wu, J., Wang, X., Cao, Y., Zhao, H., y Zhu, L. (2017). Cryptococcosis in patients with hematological diseases: a 14-year retrospective clinical analysis in a Chinese tertiary hospital. *BMC Infectious Diseases*, 17, 463. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2561-z>
- Wengenack, N. L., y Binnicker, M. J. (2009). Fungal molecular diagnostics. *Clinics in Chest Medicine*, 30(2), 391-408, viii. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.014>
- WHO. (2011). *Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children*. Geneva:

World Health Organization. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299520/>

- Willemsen, M., Breynaert, J., y Lauwers, S. (1997). Comparison of Auxacolor with API 20 C Aux in yeast identification. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 3(3), 369-375.
- Williamson, P. R., Jarvis, J. N., Panackal, A. A., Fisher, M. C., Molloy, S. F., Loyse, A., y Harrison, T. S. (2017). Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. *Nature Reviews. Neurology*, 13(1), 13-24. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.167>
- Worasilchai, N., Tangwattanachuleeporn, M., Meesilpavikkai, K., Folba, C., Kangogo, M., Gross, U., ... Chindamporn, A. (2016). Diversity and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* isolates in Thailand. *Medical Mycology*. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw130>
- Wozniak, K. L., Olszewski, M. A., y Wormley, F. L. J. (2015). Molecules at the interface of *Cryptococcus* and the host that determine disease susceptibility. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 78, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.013>
- Xu, X.-G., Pan, W.-H., Bi, X.-L., Fang, W., Chen, M., Zhu, Y., ... Qi, Z.-T. (2013). Comparison of clinical features in patients with persistent and nonpersistent cryptococcal meningitis: twelve years of clinical experience in four centers in China. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(8), 625-631. <https://doi.org/10.1111/cns.12135>
- Zerpa, R., Huicho, L., y Guillen, A. (1996). Modified India ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2290-2291.
- Zunt, J. R. (2002). Central nervous system infection during immunosuppression. *Neurologic Clinics*, 20(1), 1-22, v.

9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA

Relacionadas con el tema de la tesis

Publicaciones:

- Sunny Sánchez Giler, Dolores Zambrano Castro, Gerardo F. Martínez Machín, Carlos M. Fernández Andreu, María T. Illnait-Zaragozí. Neurocriptococosis en el contexto de la infección con el VIH en Guayaquil, Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2016; 68(1): 20-29.
- Valeria Barcia Castilla, Sunny Sánchez Giler. Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por *Cryptococcus spp.* *Revista Ciencia UNEMI* 2016; 9(20): 63-67.
- Sunny Sánchez, Dolores Zambrano, Maylen García, César Bedoya, Carlos Fernández, María Teresa Illnait-Zaragozí. Caracterización molecular de *Cryptococcus neoformans* aislados de pacientes con VIH. Guayaquil, Ecuador. *Revista Biomédica* 2017; 37(3). ISSN 0120-4157.

Eventos científicos:

- XVII Congreso Panamericano de Infectología API 2015 (Quito, Mayo de 2015). Manifestaciones clínicas de la criptococosis en Guayaquil. Autores: Sunny Sánchez, Dolores Zambrano, Ma. Teresa Illnait, Jenny Marcillo, Susana Campozano.
- Evento Internacional La Universidad en siglo XXI, ESPAMFL (Calceta, Octubre de 2016). Caracterización molecular de *Cryptococcus neoformans* en Guayaquil, Ecuador. Autores: Sunny Sánchez, Dolores Zambrano, Sebastián Orozco.

- XVIII Congreso Panamericano de Infectología. VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas. API PANAMA 2017 (Panamá, Mayo de 2017). Patrones de susceptibilidad antifúngica de *Cryptococcus neoformans* aislados de pacientes con VIH en el Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña”. Sunny Sánchez, Dolores Zambrano, Sebastián Orozco.

No relacionadas con el tema de la tesis

Publicaciones:

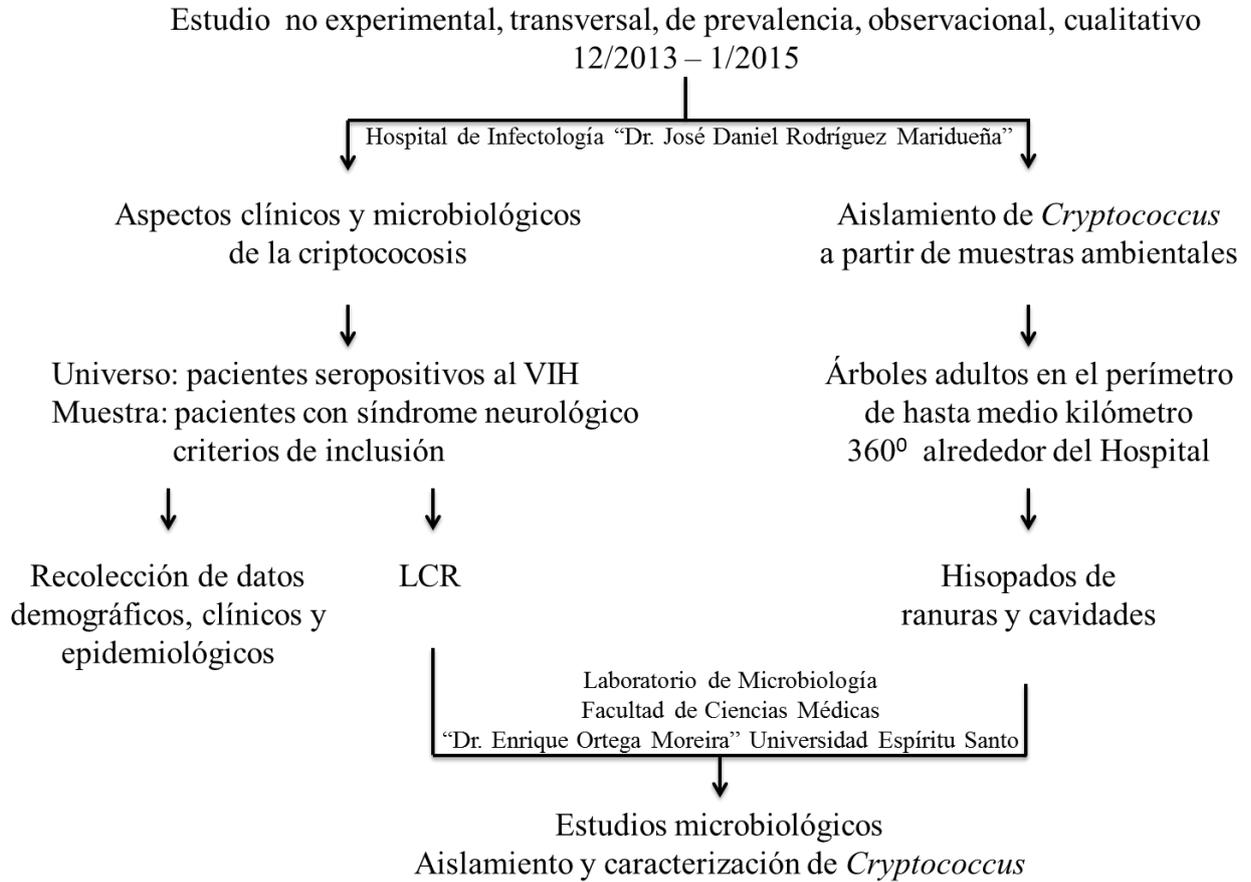
- Yuli Sánchez Giler, Jerónimo Gaibor Yáñez, Sunny Sánchez Giler. Uso de eritropoyetina subcutánea en anemia hipoplásica congénita. Reporte de un caso. Revista Med Hoy 2004; 20(1): 32-36.
- Sunny Sánchez Giler, Yuli Sánchez Giler, Jerónimo Gaibor Yáñez, José Sánchez Giler, Harold Vinuesa Albiño. Tuberculosis Pulmonar complicada con neumonía en paciente diabético Juvenil. Reporte de un caso y Revisión de la Literatura. Revista Médica Nuestros Hospitales 2005; 40-41: 426-32.
- Sunny Sánchez Giler. Seroprevalencia de *Treponema pallidum* en estudiantes de 16 a 18 años de edad de colegios fiscales de Guayaquil. Análisis retrospectivo. MedPre 2011; 1 (2): 17-26.
- Sunny Sánchez Giler, Dolores Zambrano Castro, Genaro Cedeño Gutiérrez, Roberto Oleas-Narea, María Sánchez-Carriel. Seroprevalencia de Herpes Simplex Tipo 1 en adultos jóvenes de unidad educativa superior de Guayaquil. Revista MedPre 2013; 3 (2): 25-28.
- Sunny Sánchez Giler. Herpes simplex tipo 2: serología en adultos jóvenes de unidad educativa superior de Guayaquil. MedPre 2014; No (vol): 37-40.
- Jorge Osiris García Regalado, César Freire Quintero, Sunny Eunice Sánchez Giler. Determinación econométrica del peso y la talla de neonatos para la ciudad de Guayaquil. Revista Médica FCM-UCSG 2014; 18 (3): 165-172.
- Steven Quezada Andrade; Sunny, Sánchez Giler. Vacuna contra la tuberculosis BCG: eficacia y efectos adversos. Revista Ciencia UNEMI 2015; 8 (16): 63-67.

Eventos científicos:

- XVI Congreso Panamericano de Infectología (Santiago de Chile, junio de 2013). Detection of *Histoplasma capsulatum* in HIV-positive patients in Guayaquil-Ecuador: Comparison between a PCR-based protocol and conventional culture technique from bone marrow samples. Autores: Sunny Sánchez, Héctor Zambrano.
- XVII Congreso Panamericano de Infectología (Quito, Mayo del 2015). Prevalencia del virus de *Epstein-Barr* en linfomas por medio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real e hibridación in situ con ARN. Autores: Sunny Sánchez, Claudia Castillo, Alan Herrera.
- XVII Congreso Panamericano de Infectología (Quito, Mayo del 2015) Identificación de *Pneumocystis jirovecii* en pacientes VIH ingresados por neumonía en el Hospital de Infectología. Autores: Jenny Marcillo, Violeta Vallejo, Washington Alemán, Sunny Sánchez.

10. ANEXOS

Anexo 1. Diagrama general de la metodología de la investigación abordada para el estudio de la neurocriptococosis en pacientes seropositivos al VIH en Guayaquil, Ecuador.



Anexo 2. Plantilla del consentimiento informado de los pacientes para participar en el estudio sobre los aspectos clínicos y microbiológicos de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.

FICHA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Protocolo de estudio de criptococosis en pacientes seropositivos al VIH.
Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña”**

Estimado paciente,

Mi nombre es _____ y soy de _____.

Estamos llevando a cabo una investigación acerca de un microorganismo que provoca una seria enfermedad que afecta fundamentalmente el sistema nervioso central que podría estar afectándolo. Ampliar los conocimientos sobre la misma será de gran importancia para Ud y para nuestra población por lo que hemos diseñado un estudio que permita recoger información y ayudar a las autoridades de salud desarrollar programas de diagnóstico y tratamiento para promover la salud en personas que pudieran estar en riesgo de padecerla.

Me gustaría contar con su consentimiento para realizar pruebas adicionales a las solicitadas por su médico en las muestras que Ud está entregando a nuestro laboratorio. Dejo a Ud la decisión de permitir o no realizar estas pruebas y utilizar los resultados obtenidos de ellas.

No se les cobrará dinero ni se les pagará por su participación. Si decide no participar en el estudio o retirarse del mismo en el momento que lo desee, esto no afectará en lo absoluto el servicio ni la atención que usted debe recibir.

Todos los datos brindados por Ud. u obtenidos en el presente estudio serán estrictamente confidenciales y privados.

Si decide participar, por favor firme esta página. Su nombre no será usado en ningún informe, pero su colaboración nos ayudará a obtener la información necesaria para tratar de resolver un problema de salud que en estos momentos le afecta a usted. Si no desea participar, gracias por su tiempo.

He leído la información de esta hoja de consentimiento y todas mis preguntas sobre el estudio y participación han sido atendidas.

Hago constar por este medio, mi disposición y consentimiento, para ser incorporado al estudio.

Acepto: Si ___ No ___

Nombre completo de la persona entrevistada: _____

Firma: _____

Fecha (día/mes/año): ___/___/___

¿ a quien contactar

Si usted desea hacer alguna pregunta más tarde puede contactar a:

Dra. Sunny Sánchez, Teléfono: 094388210.

Anexo 3. Ficha para la colecta de datos de los pacientes incluidos en el estudio sobre los aspectos clínicos y microbiológicos de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.

FICHA PARA LA COLECTA DE DATOS

**Protocolo de estudio de criptococosis en pacientes seropositivos al VIH.
Hospital de Infectología "Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña"**

Datos generales

Nombre y apellidos: _____ CI: _____
 Número de historia clínica: _____ Edad: _____ años Sexo: _____
 Dirección: _____
 Teléfono de contacto: _____

Datos al ingreso:

Fecha: __/__/__ Sala: _____ Cama: _____

Impresión diagnóstica: _____

Glasgow: 15-13 _____ 12-9 _____ <8 _____

Síntomas y signos: cefalea __, cambios conductuales __, vómitos __, temperatura >38 __, trastornos visuales __, signos meníngeos __, convulsiones __, pérdida peso __, adenopatías __, déficit motor __, otros _____

Tiempo de evolución de los síntomas y signos: < 1 sem _____ 1-4 sem _____ > 4 sem _____

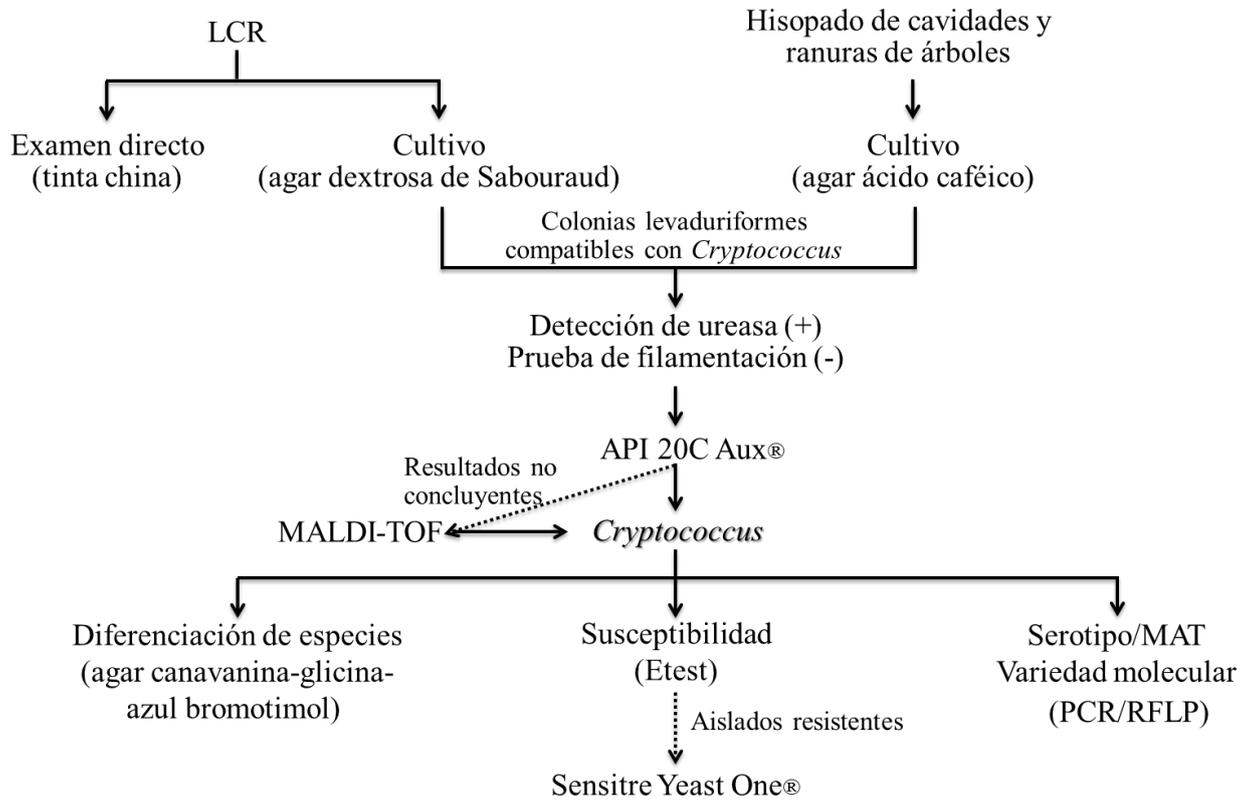
Uso de TARVAE: No __ Si __ Esquema: _____

Inicio: __/__/__ Hasta: __/__/__

Datos de laboratorio:

Tipo de examen	Resultado	Fecha
Hemoglobina		
Hematocrito		
Plaquetas		
Leucocitos		
CD4		
Carga viral (VIH)		
Tinta China en LCR		
Cultivo micológico		

Anexo 4. Diagrama de trabajo para el aislamiento, identificación y caracterización de *Cryptococcus* recuperados a partir de muestras clínicas y ambientales en el marco del estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.



Anexo 5. Aval de la Comisión Científica Especializada de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” otorgado al protocolo de la investigación para el estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
“PEDRO KOURÍ”**
Ministerio de Salud Pública

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

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

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK)

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

Por este medio se hace constar que la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CEM), como órgano asesor científico-técnico de la Vicedirección de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) de La Habana, Cuba, ha dado su aprobación al Protocolo de Investigación del trabajo para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud titulado: **Criptococosis en el Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador. Aspectos clínicos y microbiológicos**, de la Dra. Sunny Sánchez Giler.



Dr. Carlos M. Fernández Andreu
Secretario CEM, IPK

La Habana, 28 de noviembre de 2013

Teléfono (53 7) 202 0430 al 40 (pizarra) Teléfono (53 7) 202 0633; Fax (53 7) 204 6051 Telex: 51 1902 CUIPK Y 51 2341 CUIPK
E-mail: cipk@ipk.sld.cu, Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km. 6 ½, Ciudad Habana, Cuba, P.O. Box: 601 Marianao 13

Anexo 6. Aval del Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” otorgado al protocolo de la investigación para el estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
“PEDRO KOURÍ”**
Ministerio de Salud Pública

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

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

COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 44-14

**“Cryptococosis en el Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador. Aspectos clínicos
y microbiológicos”**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL
Dra Sunny Sánchez Giler**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Se aprueba el protocolo presentado.

Dado, en el IPK, La Habana, a los 11 días del mes de Febrero de 2015

Dr Eric Martínez Dr.Cs
Presidente

Lic. Ana Margarita Montalvo Dr.C.

Lic. Roberto Fernández Llanes

Dra Nereyda Cabrera

Dr. René Gato

23/2/2015

Teléfono (53 7) 202 0430 al 40 (pizarra) Teléfono (53 7) 202 0633; Fax (53 7) 204 6051 Telex: 51 1902 CUIPK Y 51 2341 CUIPK
E-mail: ctipk@ipk.sld.cu, Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km. 6 ½, Ciudad Habana, Cuba, P.O. Box: 601 Marianao 13

Anexo 7. Aval Comité de Bioética COBI-ASFORUM otorgado al protocolo de la investigación para el estudio de los aspectos clínicos, microbiológicos y medioambientales de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.



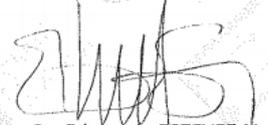
Dra. Sunny SÁNCHEZ GILER
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURI
LABORATORIO DE MICOLOGÍA
Investigadora del Estudio "Criptococosis en el Hospital de Infectología de Guayaquil,
Ecuador. Aspectos clínicos y microbiológicos"
Guayaquil

De nuestra consideración

El Comité de Bioética (COBI) aprueba el 04 MAR 2015 los siguientes documentos que forman parte del protocolo de investigación citado para optar por el título de Doctor en Ciencias de la Salud:

1. Protocolo de investigación "Criptococosis en el Hospital de Infectología de Guayaquil, Ecuador. Aspectos clínicos y microbiológicos". Versión en español La Habana, 2013
2. Apéndices: Formulario de consentimiento Informado. Versión La Habana, 2013
3. Carta de compromiso de la investigadora
4. CV de la Dr. Sunny SANCHEZ (2015)

Muy atentamente,



Dr. Edmundo ESTEVEZ M.
By Bioethics Committee COBI



BIOETHICS COMMITTEE COBI-IRB-1
FWA00002482 IEC IORG0001932 IORG0007827 IRB00002438 IRB00009390 IEPIDNFI/125754-12
Quito.- ECUADOR

Anexo 8. Selección de la muestra de pacientes para el estudio de los aspectos clínicos, y microbiológicos de la neurocriptococosis en pacientes con VIH-sida en Guayaquil. Diciembre 2013 - enero 2015.

