

Título: Criptococosis y su agente causal. Aportes a su epidemiología y patogenia.

Autores: Dra. María Teresa Illnait Zaragozaí mtillnait@ipk.sld.cu / mtillnait@infomed.sld.cu, Dr. Gerardo F. Martínez Machín, DrC. Carlos M. Fernández Andreu, Lic. Mayda R. Perurena Lancha, Téc. Iraida Rodríguez Gutiérrez, Lic. Luis E. Jerez Puebla, Lic. Eduardo A. Valdés Ramos, Lic. Ernesto X. Monroy Vaca.

Centro de procedencia: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

Introducción

El incremento de forma dramática del número de personas inmunocomprometidas debido fundamentalmente a la pandemia del VIH/sida, ha dado pie a que a más de medio siglo del descubrimiento de *C. neoformans* como agente causal de la criptococosis, haya emergido desde una oscuridad relativa (Levitz & Boekhout, 2006). Aún en estos días, a pesar de la introducción de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) se reportan cerca de un millón casos (Park *et al.*, 2009). En Cuba, la infección por esta levadura, fue descrita desde inicios de los años '50 generalmente asociada al alcoholismo y diversos desórdenes inmunológicos (Curbelo, 1951). Actualmente en el laboratorio de micología del Instituto “Pedro Kouri” (LMIPK) se diagnostican como promedio entre 8 y 15 casos anuales (Illnait *et al.*, 2001) mientras que el análisis de 211 autopsias de fallecidos con VIH/sida, reveló la presencia de esta micosis en más del 29 % de los casos, demostrando que el mismo es un trastorno más grave y común que lo reportado anteriormente (Arteaga *et al.*, 1998).

Unido a estas alarmantes cifras, la neurocriptococosis es considerada la micosis sistémica de mayor letalidad. Los reportes reflejan una mortalidad del 60 % con un tiempo de vida medio de 14 días a pesar del tratamiento antifúngico convencional, cifra que alcanza el 100 % en los pacientes no tratados o con tratamientos iniciados tardíamente dejando a su paso 624,700 muertes anuales solo en personas seropositivas al VIH (Park *et al.*, 2009; Perfect *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha comprobado que los individuos que sobreviven al episodio inicial de infección, tienen alta tendencia a presentar recaídas a pesar de la implementación de las medidas recomendadas. Las caracterizaciones moleculares en su mayoría, han dado pie a la hipótesis sobre el origen de la criptococosis recurrente debido a la persistencia de la cepa inicial (Desnos-Ollivier *et al.*, 2010), condición hasta ahora no explorada en los pacientes cubanos.

Debido a que la transmisión hombre a hombre solo ha sido demostrada bajo circunstancias excepcionales, se presume que la infección ocurre como consecuencia de la exposición a fuentes ambientales (Casadevall & Perfect, 1998). Hasta el momento no existían antecedentes de estudios epidemiológicos sobre esta levadura en Cuba, en tanto que los reportados internacionalmente sugieren que los principales reservorios del serotipo A (principal agente en Cuba) han sido relacionados con el suelo y las excretas de palomas, especialmente cuando están protegidos de los rayos directos del sol

En este informe se resumen los trabajos realizados en aras de lograr un mejor entendimiento de la criptococosis a través del estudio de aislamientos clínicos y ambientales cubanos de su agente causal, siendo el primero de su tipo en el país.

Objetivos

1. Conocer posibles fuentes de infección humana mediante el estudio de aislamientos de origen clínico y ambiental empleando el STR como técnica de caracterización.

2. Estudiar las posibles causas de recurrencia de la meningitis criptocócica a través de la caracterización de aislamientos seriados obtenidos de pacientes bajo esta condición.

Diseño Metodológico

Material biológico empleado:

Microorganismos: A demás de los controles biológicos pertinentes, los estudios que a continuación se relacionan comprendieron el análisis de aislamientos clínicos y ambientales (a partir de excretas de palomas). Se utilizaron un total de 202 aislamientos clínicos pertenecientes a la colección de hongos del LMIPK. Estos fueron obtenidos durante el proceso de diagnóstico que brinda el laboratorio desde hace más de dos décadas. El 91 % de estas cepas habían sido aisladas de líquido cefalorraquídeo, en tanto que las restantes se obtuvieron a partir de sangre, orina, biopsia, semen y lavado bronqueoalveolar; el 65 % del total de los pacientes procedían de La Habana y el 77 % eran seropositivos al VIH. Un total de 68 aislamientos a partir de excretas de palomas fueron incluidos. Los mismos procedían de palomares bien distribuidas a lo largo de la isla.

Obtención de material empleado en las pruebas de caracterización genética: Se obtuvo a partir de cultivos frescos en ADS a 30 °C durante 48 h de las cepas a estudiar. Se prepararon suspensiones de cada una en solución de lisis (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos) y se sometieron a ruptura mecánica en MagnaLyser (Roche Diagnostics) durante 30 seg a 6500 rpm. A continuación, se purificó el ADN mediante el LC MagnaPure empleando el estuche III según lo recomendado por el fabricante (Roche Diagnostics). La pureza y el rendimiento obtenido se estimaron por la absorbancia de luz UV en espectrofotómetro 130 Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, USA).

Caracterización taxonómica hasta nivel de serotipo y tipo de apareamiento de las cepas cubanas de *Cryptococcus*.

La identidad de todos los aislamientos sometidos a este estudio fue confirmada mediante métodos moleculares. En un primer paso se realizó análisis de los patrones genéticos mediante la comparación de las tallas de fragmentos polimórficos obtenidos mediante enzimas de restricción (AFLP, de sus siglas en inglés) (Boekhout *et al.*, 2001). Posteriormente, uno de cada 10 aislamientos, de cada agrupación genética obtenida, fue seleccionado para su identificación hasta nivel de especie mediante secuenciación de las regiones ITS1/5.8S/ITS2 y D1-D2 (Katsu *et al.*, 2004).

Partiendo del ADN purificado de las cepas previamente confirmadas como *C. neoformans*, se realizaron cuatro reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) para la amplificación de los alelos *MATa* y *MATα* del locus STE20 tanto del serotipo A como D con vistas a determinar su serotipo y tipo de apareamiento (Bovers *et al.*, 2006).

Determinación de las posibles fuentes de infección por *C. neoformans* var. *grubii* a través de la comparación de los patrones genéticos de cepas clínicas y ambientales.

Quedaron incluidos en el estudio 129 cepas clínicas (todas de pacientes diferentes) y las 68 obtenidas a partir de excretas de palomas. Como método de estudio se utilizó el análisis del número de fragmentos cortos repetitivos (STR, de sus siglas en inglés) para lo que se seleccionaron y evaluaron 9 microsatélites marcadores según criterios previamente establecidos (de Valk *et al.*, 2009). A modo de referencia se empleó el AFLP (Boekhout *et al.*, 2001).

Identificación de las causas de recurrencia de la meningitis criptocócica en pacientes cubanos.

Se seleccionaron 19 aislamientos obtenidos de siete pacientes con infecciones recurrentes (seis VIH positivos y uno VIH negativo) ingresados en el IPK entre 1995 y 2001, justo antes de introducida en Cuba la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE). Todos habían sido admitidos en el centro de atención médica a pacientes con sida del IPK. Los aislamientos iniciales se obtuvieron al momento del diagnóstico y antes de implementar el tratamiento mientras que los subsecuentes se recibieron durante o después del empleo de fármacos antifúngicos.

A este grupo de cepas se les determinó la susceptibilidad in vitro frente a anfotericina B, 5 fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol utilizando el método de microdilución en medio líquido según el documento M27-A3 del Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, de sus siglas en inglés) (CLSI, 2008) así como el estudio de sus perfiles genéticos mediante STR (de Valk *et al.*, 2009).

Aspectos éticos: Los trabajos fueron aprobados por el Comité Científico y el Comité de Ética del Instituto “Pedro Kouri”, La Habana, Cuba y todos los datos se analizaron de forma anónima.

Resultados y Discusión

Re-identificación de las cepas y determinación del serotipo/tipo de apareamiento: En este trabajo, basados en el comportamiento de las cepas en las pruebas convencionales de identificación, el 100 % de las recuperadas a partir de muestras clínicas y el 96,5 % (83/86) de las obtenidas de excretas de palomas fueron presuntivamente identificadas como *C. neoformans*, en tanto que las restantes fueron reconocidas como *C. gattii*. Los avances alcanzados han permitido advertir que *C. neoformans* (especialmente el serotipo A) es responsable de la mayoría de los aislamientos clínicos y ambientales, presentando una amplia distribución a nivel mundial (Lin *et al.*, 2008). Por su parte, los estudios precedentes de caracterización de cepas autóctonas tanto de origen humano como ambiental, han dado como resultado un total predominio de esta especie (Fernández *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2004).

El análisis de las huellas genéticas del conjunto de cepas estudiadas mediante AFLP, demostró la presencia de 16 patrones únicos y siete conglomerados con 75, 23, 17, 9(2), 6 y 3 aislamientos respectivamente (datos no mostrados). La posterior secuenciación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 / D1-D2 permitió corroborar la identificación de los aislamientos presuntivamente identificados como *C. neoformans* var. *grubii* lo que confirma la prevalencia de esta especie en Cuba y los presumiblemente reconocidos como *C. gattii*, fueron finalmente identificados como *C. laurentii*.

En este trabajo los estudios moleculares realizados para determinar el tipo de apareamiento, demostraron que todos los aislamientos previamente identificados como *C. neoformans* var. *grubii* son portadores del alelo *MAT α* . Existen evidencias de que durante el entrecruzamiento genético, tanto el alelo, *MAT α* como *MAT α* , son segregados en igual proporción, sin embargo este último se presenta en una proporción 30:1, sugiriendo una ventaja selectiva en la supervivencia. La posibilidad de poder determinar el tipo de apareamiento resulta de vital importancia en la caracterización de *C. neoformans*. Posiblemente el locus *MAT α* , sea el principal responsable de la reproducción entre organismos del propio tipo y la fructificación haploide en esta levadura. Esta forma de reproducción constituye un potenciador de la variación genética en las poblaciones naturales de los organismos. La diversidad genética resultante puede aumentar la eficacia de selección natural y realzar la oportunidad de colonizar satisfactoriamente nuevos ambientes (Matsumoto *et al.*, 2007).

El hallazgo de que las cepas cubanas de *C. neoformans* incluidas en este estudio correspondan al tipo A α , confirman los resultados anteriores sobre el predominio de este, tanto en muestras clínicas como ambientales en Cuba y a nivel mundial.

Estudio de diversidad genética de aislamientos de origen clínico y ambiental mediante STR y AFLP: Los 9 marcadores seleccionados para nuestro trabajo a partir de la secuencia de la cepa tipo H99, resultaron ser polimórficos al mostrar entre 5 y 51 alelos diferentes por cada uno. La especificidad para *C. neoformans* var. *grubii* fue demostrada al no obtener productos de amplificación al aplicar ADN de los aislamientos CBS10511 (*C. neoformans* serotipo D), CBS6956 (*C. gattii* serotipo B) y CBS 10101 (*C. gattii* serotipo C). El poder discriminatorio de cada uno de los marcadores de forma individual y de conjunto superó el 0.99, siendo los de mayor variabilidad y poder discriminatorio CNA2c y CNA4a.

El panel en su conjunto permitió discernir en la colección analizada 104 genotipos diferentes distribuidos en 20 grupos. Los complejos de microsatélites (CM) fueron arbitrariamente definidos por genotipos que discrepaban entre sí en más de dos marcadores mientras que dentro de cada uno, la variabilidad fue atribuible solamente a uno o dos (figura 1). De esta forma, se identificaron 11 CM y 9 genotipos (18 aislamientos) que no quedaron incluidos en ninguno de los complejos. Los análisis evidenciaron que más del 70 % de todos los aislamientos quedaron congregados en 4 de los 11 CM.

La distribución temporal de CM3, el cual abarcó el mayor número de cepas clínicas (n=37), demostró la presencia de este genotipo a lo largo de casi dos décadas. De forma llamativa, CM1 tuvo una amplia representación de toda la isla e incluyó el 96 % de todos los de origen ambiental y solo dos clínicas (p < 0,001). La presencia de complejos constituidos únicamente o en su mayoría por aislamientos ambientales sugiere que estos se encuentran mejor adaptados al microambiente de donde fueron recuperados y pudieran ser menos patógenos para los seres humanos. De otra parte, el hallazgo de agrupaciones solamente integrados por aislamientos de origen clínico (CM4 por pacientes VIH positivos, CM6 VIH por negativos, CM10 y CM11 por ambos tipos de pacientes) sugiere la presencia de nichos adicionales de *C. neoformans* var. *grubii* como posibles fuentes de infecciones en humanos.

Esta levadura ha sido tradicionalmente asociada a las excretas de palomas. No obstante, la diversidad de los aislamientos ambientales solo se conoce parcialmente ya que los estudios comparativos entre las huellas genéticas obtenidas de aislamientos de una misma área geográfica han sido escasos y sugieren una estrecha relación entre los mismos (Litvintseva et al., 2005).

Los patrones obtenidos mediante AFLP, técnica de referencia para el genotipado de esta levadura, se emplearon para la evaluación del resultado derivado del uso de los marcadores seleccionados mediante STR observándose que i). aunque un número relativamente pequeño de aislamientos clínicos (11 %), quedó indiscutiblemente separado en una agrupación, subdivisión totalmente compatible con CM4, el resto de los aislamientos conformaron las restantes congregaciones de forma indistinta; ii) de manera general, el AFLP mostró menor variabilidad genética en esta colección al compararla con la obtenida mediante STR, al no evidenciar segregación entre los aislamientos clínicos y ambientales.

Otro de los métodos moleculares de tipificación empleado para determinar las características genéticas del complejo *C. neoformans* ha sido el análisis de secuencias multilocus (MLST, de sus siglas en inglés) (Litvintseva et al., 2005). En contraposición con el STR, método de caracterización altamente discriminatorio que brinda un genotipado rentable en corto tiempo (de Valk, 2009), el MLST es considerada como una técnica laboriosa y costosa quedando demostrada la superioridad de la tipificación mediante STR con los marcadores seleccionados.

En resumen, nuestros resultados, confirman la utilidad del panel de marcadores propuesto como dianas en la tipificación molecular de *C. neoformans* var. *grubii*. Estos demostraron ser excelentes blancos al permitir el reconocimiento de genotipos individuales y la relación entre diferentes grupos genéticos. Su empleo en el estudio de cepas ambientales cubanas demostró la ausencia de variabilidad genética en tiempo y espacio lo que sugiere una relación clonal de las mismas; por su parte, la mayoría de los aislamientos clínicos eran provenientes de La Habana y se encontraban distribuidos en varios de los CMs, soportando la hipótesis sobre la posible presencia de nichos ecológicos de infección humana adicionales diferentes de las excretas de palomas.

Estudio de la susceptibilidad in vitro y caracterización molecular de *C. neoformans* aislados de pacientes con neuro-criptococosis recurrente: Hasta el momento no se habían realizado en Cuba estudios sobre la susceptibilidad antifúngica y la diversidad genética de aislamientos consecutivos de *C. neoformans* obtenidos de pacientes. Atendiendo a estos parámetros, en el presente trabajo se exponen los resultados del análisis de 19 cepas aisladas de siete pacientes con meningitis criptocócica recurrentes durante el período pre-TARVAE. La media de aislamiento/paciente fue de 2,71 (rango 2-4), el tiempo promedio entre los aislamientos fue de 52,5 días (rango 13-123). A excepción de paciente No. 7 (VIH negativo) todos tuvieron desenlace fatal a pesar de haber recibido tratamiento antifúngico.

La determinación de la susceptibilidad se realizó empleando el método de referencia de microdilución en medio líquido (CLSI, 2008). Cuando todos los resultados obtenidos se consideraron de forma conjunta (tabla 1), se evidenció que los rangos más amplios y las CIMs más elevadas correspondieron a fluconazol (0,25-8 µg/mL) y fluocitosina (0,5-8 µg/mL) mientras que las más bajas fueron para isavuconazol, voriconazol y posaconazol (en orden creciente). Anfotericina B, fluocitosina y posaconazol mostraron un máximo de variación de 3 log₂ en los valores de CIM entre las series de aislamientos de los pacientes estudiados. Aunque todos los aislamientos se consideraron susceptibles, en algunas series de aislamientos se observó incremento de las CIM para determinados azoles a lo largo del tiempo (de hasta 4 log₂ para fluconazol, itraconazol, voriconazol e isavuconazol en el paciente No. 6; para fluconazol (4 log₂), itraconazol y voriconazol (6 log₂) en el paciente No. 7. Nuestros resultados en cuanto a la actividad in vitro de los principales antifúngicos son similares a los publicados anteriormente (Pfaller et al., 2004; Fernández et al., 1998).

El empleo del STR para la caracterización molecular de los aislamientos estudiados, permitió la detección de la variabilidad genética entre los mismos. Solo en dos de los pacientes, con 2 y 3 aislamientos respectivamente, las cepas estudiadas presentaron idéntico patrón, en tanto que para el resto de los pacientes (14 aislamientos) el STR demostró la presencia de diferentes genotipos (figura 2).

Empleando diferentes técnicas, otros autores han estudiado la relación molecular de los aislamientos de *C. neoformans* obtenidos durante un mismo episodio de infección o durante infecciones recurrentes (Litvintseva et al., 2005). Aunque los resultados obtenidos son variables, la infección por cepas múltiple ha sido rara vez considerada; la mayoría de los autores sugieren que la persistencia o recurrencia de la infección es usualmente causada por recaída de la cepa original (Igreja et al., 2004; Litvintseva et al., 2005).

Estos resultados sugieren que la recurrencia de la infección en la mayoría los pacientes estudiados, no estuvo asociada a la resistencia a los medicamentos, si no probablemente a la co-infección con diferentes cepas o variedades genéticamente modificadas durante la terapia de mantenimiento a largo plazo.

Conclusiones

Se demostró el amplio predominio de *C. neoformans* var. *grubii* MAT α tanto en muestras clínicas como ambientales en Cuba. De forma general, la interpretación de todos los resultados obtenidos ha brindado nuevas luces a la patogenia y epidemiología de la criptococosis y su agente causal para nuestro país con implicaciones más allá de sus fronteras i) Esta es la primera ocasión en que se emplea el STR en la caracterización genotípica de *Cryptococcus*. Los marcadores seleccionados demostraron ser excelentes herramientas para el estudio epidemiológico de este patógeno, ii) el hecho de que la mayoría de las agrupaciones genéticas se encuentran conformadas por cepas de origen clínico, sugiere la presencia de nichos de *C. neoformans* var. *grubii* adicionales hasta ahora no estudiados que pudieran causar infecciones en humanos, iii) la caracterización de la susceptibilidad y genética de las cepas aisladas de pacientes con criptococosis recurrente sugieren que este fenómeno es mayormente debidos a la co-infección con diferentes genotipos.

Referencias bibliográficas

- Arteaga E, Capó De Paz V, Pérez-Fernández-Terán ML. Micosis oportunistas invasivas en el sida. Un estudio de 211 autopsias. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 33-5.
- Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, Dromer F, Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 2001; 147: 891-907.
- Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, Hoogveld HL, Boekhout T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. FEMS Yeast Res. 2006; 6: 599-607.
- Casadevall A, Perfect JR. Introduction to the pathogen. En: *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington DC 1998.
- Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
- Curbelo A. Septicemia y meningitis a *Cryptococcus neoformans*. Arch Hosp Univ (Cuba). 1951; 9: 324-330.
- de Valk HA, Meis JF, Bretagne S, Costa JM, Lasker BA, Balajee SA, Pasqualotto AC, Anderson MJ, Alcázar-Fuoli L, Mellado E, Klaassen CH. Interlaboratory Reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: Proof of concept. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 180-7.
- Desnos-Ollivier M, Patel S, Spaulding AR, Charlier C, Garcia-Hermoso D, Nielsen K, Dromer F: Mixed infections and in vivo evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. mBio 1(1), pii: e00091-10.
- Fernández CM, Martínez GF, Álvarez LP, Rodríguez R, Álvarez C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated in Havana City. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85: 120.
- Fernández CM, González M, Illnait MT, Martínez GF. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. Rev Cuba Med Trop 1998; 50: 48-53.
- Illnait MT, Valdés IC, Fernández CM, Mendoza D, Perurena MR, Martínez GF. Criptococosis: una alerta necesaria. Rev Cubana Med Trop 2001; 53: 224-5.
- Igreja RP, Dos Santos-Lazera M, Wanke B, Gutierrez-Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W: Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian City, Rio de Janeiro. Med Mycol 2004, 42:229-38.

- Katsu M, Kidd S, Ando A, Moretti-Branch; Mikami Y, Nishimura K, Meyer W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. FEMS Yeast Res 2004; 4: 377-88.
- Lin X, Nielsen K, Patel S, Heitman J. Impact of mating type, serotype, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2008; 76: 2923-38.
- Levitz SM, Boekhout T. *Cryptococcus*: The once-sleeping giant is fully awake. FEMS Yeast 2006; 6: 461-462.
- Litvintseva A P, Kestenbaum L, Vilgalys R, Mitchell TG. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 2005, 43: 556-564.
- Martínez GF, Barrial L, Illnait MT, Valdés IC, Fernández CM, Perurena MR, Polo JL, Mendoza Dianeya. Utilidad de la D-prolina en la diferenciación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*. Rev Cub Med Trop 2004; 56: 77-9.
- Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, De Souza-Carvalho M, Soures Mendes-Giannini MJ. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São paulo state, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 2007; 49: 41-7.
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS. 2009, 23: 525-30.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC: Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2010, 50: 291-322.
- Pfaller M, Zhang J, Messer S, Tumberland M, Mbidde E, Jessup C, Ghannoum M. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from Ugandan AIDS patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32: 191-9.

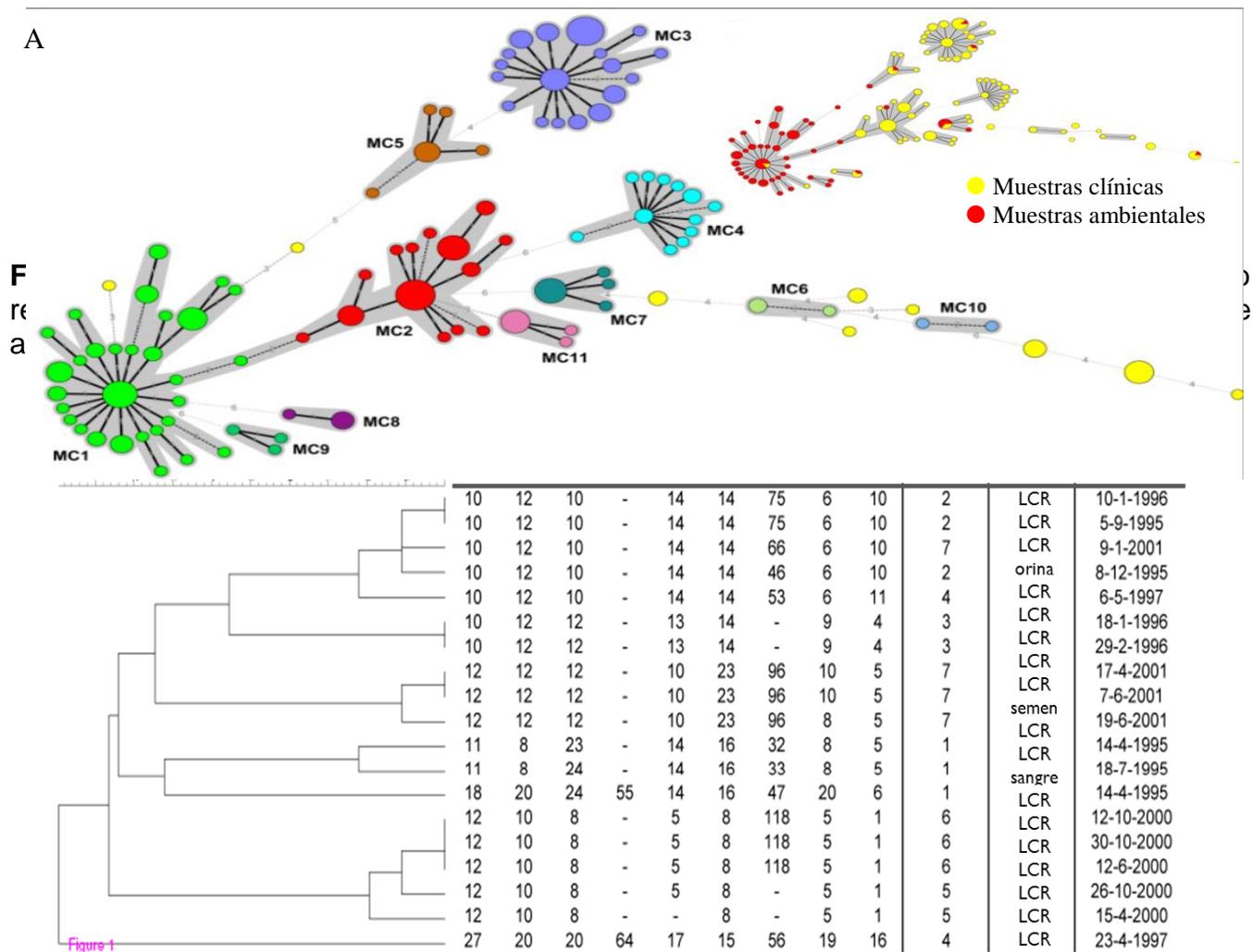


Figura 2. Detalles de los 19 aislamientos de *C. neoformans* obtenidos de siete pacientes y la relación entre los diferentes genotipos. Los números la columna de genotipos corresponde al número de repeticiones observadas en los marcadores CNA2a, CNA2b, CNA2c, CNA3a, CNA3b, CNA3c, CNA4a, CNA4b y CNA4c, respectivamente. El guión indica que no se obtuvo resultado. El árbol fue construido mediante el programa UPGMA y la barra de escala indica el porciento de similitud.

Tabla. 1 Susceptibilidad a siete antifúngicos empleando el método de microdilución en medio líquido según el documento M27-A2 del CLSI.

Pacien te No.	Cepa No.	Concentración inhibitoria mínima (µg/mL) lectura a las 72 h						
		Anf B	5FC	Flu	Itr	Vor	Pos	Isa
1	0836099 2	0,05	8	4	0,125	0,016	0,125	0,016
	0836097 5	0,25	2	4	0,063	<0,016	0,063	<0,004
	0836100 1	0,25	4	4	0,25	0,25	0,125	<0,004
2	0836099 7	0,125	2	1	0,031	0,063	0,125	<0,004
	0836097 0	0,25	2	2	0,063	0,063	0,125	0,016
	0836099 1	0,125	1	1	0,031	<0,016	0,063	0,008
3	0836097 1	0,25	2	2	0,063	0,063	0,016	0,016
	0836097 2	0,125	8	2	0,125	0,125	0,031	<0,004
4	0836098 2	0,25	2	2	0,031	0,031	0,031	0,008
	0836098 9	0,25	1	4	0,031	0,125	0,063	0,008
5	0836092 4	0,25	2	1	<0,016	<0,016	0,016	0,004
	0836092 5	0,25	1	0,25	0,031	<0,016	0,016	<0,004
6	0836105 6	0,125	0,5	0,25	<0,016	<0,016	0,063	<0,004
	0836105 2	0,125	0,5	4	0,125	0,125	0,016	0,031
	0836105 3	0,25	1	8	0,125	0,25	0,016	0,063
7	0836092 6	0,25	0,5	0,5	<0,016	<0,016	0,031	0,016
	0836093 0	0,25	0,5	0,5	0,031	0,031	0,016	0,004
	0836097 8	0,125	1	1	0,031	0,063	0,016	<0,004
	0836094 2	0,25	4	8	0,5	0,25	0,031	<0,004
Rango MG CIM ₅₀		0,125-0,5 0,30 0,25	0,5-8 2,09 2	0,25-8 2,51 2	0,016-0,5 0,051 0,031	0,016-0,25 0,048 0,025	0,016- 0,31 0,037	0,004- 0,06 0,0077

CIM ₉₀	0,25	4	4	0,125	0,125	0,031	0,004
						0,125	0,016

Anf B = anfotericina B; 5FC = 5 fluorocitosina; Flu = fluconazol; Itr = itraconazol, Vor=voriconazol, Pos=posaconazol, Isa=isavuconazol

MG = Media geométrica

CIM_{50/90} = Mínima concentración del antifúngico capaz de inhibir al 50 y 90 % del crecimiento de la cepa en comparación con el control de crecimiento en el pocillo sin droga.