



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
Departament de Genètica i Microbiologia

**Estudio de los factores de
patogenicidad de
*Cryptococcus gattii***

Eidi V. Alvarado Ramírez
Tesis doctoral
Director: Dr. Josep M. Torres-Rodríguez
2008

...a Barcelona, ciudad increíble

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda física, intelectual, moral (...y a veces hasta espiritual) que me brindaron un gran grupo de personas de forma totalmente desinteresada.

Al Dr. Josep M. Torres-Rodríguez, por darme la oportunidad de desarrollar mi carrera científica, siempre bajo su tutela, guiada por su amplia experiencia y conocimientos, gracias por confiar en mí y permitirme tomar decisiones. En estos casi 4 años de constante trabajo en equipo, he llevado a cabo varios proyectos y he aprendido mucho, tanto a nivel laboral como personal. Gracias por brindarme su amistad incondicional y por apoyarme en situaciones difíciles y delicadas.

A la Lic. Paki Murciano G, por ayudarme en la realización de gran parte de los experimentos, tienes un gran papel en este trabajo, gracias amiga por tu apoyo moral, siempre allí presente, por tu buen humor y tu filosofía de vida. Apa Salut!

A las Licenciadas Gemma Segura R y Maite Sellart A., por aportar sus conocimientos, organización y buen humor. Pasamos realmente buenos momentos en el laboratorio, irrepetibles.

A las Técnicas Teresa Jiménez y Montserrat Hidalgo por estar siempre pendientes de mí, de mis cosas, de mi trabajo y de mi persona, me sentí muy mimada por ustedes dos.

A las Doctoras Teresa Baró y C. Alia Aponte, por su amistad, buenos consejos, comentarios y disposición. Siempre aportando palabras de ánimo además de buenas compañeras docentes, gracias.

A la Dra. Carme Casadevall Fusté, por su paciencia y por dedicarme su tiempo al asesorarme en los experimentos y técnicas de biología molecular.

Al Dr. Leonel Mendoza por asesorar y permitir realizar mi estancia en Estados Unidos en su laboratorio en la Universidad de Michigan (MSU) donde se llevó a cabo gran parte de los experimentos de biología molecular presentados en esta tesis.

A la Lic. Edith Sánchez de México, gracias por tu valiosa amistad, mi estancia en MSU fue mucho más rica, por haberte encontrado allí amiga, gracias por tus consejos y asesoramiento para el área de biología molecular.

A mi familia, por su apoyo incondicional, gracias a mis padres Blanca y Víctor, y a mi hermano Daniel, por confiar en mí en todas las decisiones que he tenido que tomar y porque a pesar de la distancia están siempre presentes, los quiero muchísimo.

A mis amigos Isabel, Anna, Wilson, Rafael, Karla, Andrés M, Citlali, Andrés (tocayo), Mariana Albert, Maribel y Aitor, por ayudarme en situaciones estresantes y por tantos momentos de diversión, bailes, salidas, reuniones, cenas, cine, paseos; en fin, me encanta tenerlos como amigos, valen muchísimo.

A ti Jonas, gracias por el apoyo informático (no se que hubiera hecho con el índice) y también por haberme invitado a jugar scrabble, gracias por tantas y tantas palabras de ánimo y apoyo. *Tack så mycket, älsklings.*

A mi gran Universidad, La Universidad Central de Venezuela y todos los profesores de la Escuela de Bioanálisis, ya que en ella aprendí las herramientas necesarias para poder afrontar gran parte de los proyectos realizados. *U-U-U-CV.*

Y finalmente a *Barcelona, ciutat increíble*, que me encanta, me ha dado muy buenos amigos, experiencias únicas e irrepetibles, buenos y malos momentos, pero de esos que hacen crecer y que duran toda la vida, yo no nací aquí, pero siento que en esta ciudad he madurado y siento que de alguna manera formo parte de ella, así como ella forma parte de mí y siempre lo será.

Para todos Muchísimas gracias. *Moltes gràcies a tothom. Tack så mycket .*

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España, con el expediente FIS PI02/0413.

Se ha recibido ayuda económica por parte del Institut Municipal de Investigació Mèdica para la finalización de ésta tesis doctoral, en los gastos relacionados con la reproducción y encuadernación.

INDICE GENERAL

<u>1</u>	<u>Introducción</u>	<u>1</u>
1.1	Antecedentes	2
1.2	Taxonomía	4
1.3	Epidemiología de la criptococosis	6
1.4	La Criptococosis: Cuadros Clínicos	9
1.4.1	Criptococosis pulmonar	9
1.4.2	Criptococosis meníngea	10
1.4.3	Criptococosis cutánea	12
1.4.4	Otras localizaciones de la criptococosis	13
1.5	Agentes Etiológicos: <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i>	13
1.5.1	Características generales	13
1.5.2	Identificación y serotipado	15
1.5.3	Factores de patogenicidad	17
1.6	Genoma de <i>Cryptococcus</i>	20
1.6.1	Gen CNLAC1	21
1.7	Métodos para evaluar <i>in vitro</i> la sensibilidad antifúngica	22
1.7.1	Anfotericina B	24
1.7.2	5-Fluorocitosina	25
1.7.3	Antifúngicos triazólicos	25
1.8	Resistencia a los antifúngicos en <i>Cryptococcus gattii</i> y <i>C. neoformans</i>	27
<u>2</u>	<u>Interés y Justificación del estudio</u>	<u>29</u>
<u>3</u>	<u>Objetivos del estudio</u>	<u>31</u>
<u>4</u>	<u>Materiales y Métodos</u>	<u>33</u>
4.1	Codificación de las cepas utilizadas	33
4.2	Cepas utilizadas en cada objetivo del estudio	34
4.2.1	Objetivo 1	34
4.2.2	Objetivo 2	35
4.2.3	Objetivo 3	35
4.2.4	Objetivo 4	36
4.3	Cepas de control de calidad	38
<u>5</u>	<u>Resultados y Discusión</u>	<u>46</u>
5.1	Objetivo 1	46
5.1.1	Artículo 1: Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> . Rev Iberoam Micol 2008; 25: 51-55	46
5.2	Objetivo 2	55
5.2.1	Artículo 2: Laccase activity in <i>Cryptococcus gattii</i> strains isolates from goats. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 150-153.	55

5.3 Objetivo 3	62
5.3.1 Artículo 3 [en preparación]: Estudio de la variabilidad del gen CNLAC1 entre <i>Cryptococcus gattii</i> y <i>Cryptococcus neoformans</i>	62
5.4 Objetivo 4	81
5.4.1 Artículo 4: MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for <i>Cryptococcus neoformans</i> and <i>Cryptococcus gattii</i> . <i>J Antimicrob Chemother</i> , 62(1):205-206.....	81
5.4.2 Alternativas al método de referencia M27-A2	88
6 Conclusiones	92
7 Referencias	95
8 Anexo	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. Variedades y serotipos..... 5

Tabla 2: *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. Fase anamorfa (forma asexual) y fase teleomorfa (forma sexual). (18) 5

Tabla 3: Punto de corte de fluconazol e itraconazol para cepas de *Candida spp.* Tomado de manual NCCLS M27-A2 (105). 23

Tabla 4: Puntos de corte de voriconazol para cepas de *Candida spp.* Tomado de Pfaller et al JCM 2006 (109)..... 23

Tabla 5: Cepas utilizadas para la determinación de la actividad ureasa (n=44). *En el artículo nº1, estas cepas corresponden a *417C, **160A y ***161A. 34

Tabla 6: Cepas utilizadas en la determinación de la actividad fenoloxidasa (n=14)..... 35

Tabla 7: Cepas utilizadas en el estudio del gen CNLAC1 (n=55)..... 36

Tabla 8: Cepas utilizadas en las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos (n=80)..... 38

Tabla 9: Límites recomendados para CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) (µg/mL) en 24 horas para las cepas ATCC® utilizadas para Microdilución en Caldo. Tomado de Manual M27-A2 (105). 38

Tabla 10: *Cryptococcus gattii* provenientes de cabras utilizadas en el estudio de la actividad lacasa (143). 56

Tabla 11: Especies, serotipos y origen de 8 aislamientos de *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans* utilizados para comparar la determinación de la actividad lacasa. 57

Tabla 12: Especie, serotipos y origen de 14 aislados de *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans*. Unidades Enzimáticas (UE) de la enzima lacasa. BE: Brote Extremeño. 58

Tabla 13: Cepas (n=55) utilizadas en el estudio de la variabilidad del gen CNLAC1. LCR: líquido cefalorraquídeo, BAL: lavado broncoalveolar, HC: Hemocultivo. *Cepas de *C. gattii* probadas con RT-PCR, escogidas al azar. 66

Tabla 14: *DDBJ accession number* usadas para la obtención de los iniciadores *forward* y *reverse* (150). *Cepa TIMM1315, *C. gattii* serotipo C utilizada en el presente estudio como cepa de referencia. 67

Tabla 15: Concentración de ARN obtenida para 2 *C. gattii* serotipo B, 2 serotipo C y *Candida krusei*. 75

Tabla 16. Límites recomendados para CMI (µg/mL) en 24 horas para las dos cepas de control de calidad utilizadas para microdilución en caldo. Tomado de Manual M27-A2 (105). ATCC® marca registrada de *American Type Culture Collection*. 83

Tabla 17. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Fungicida Mínima (µg/mL) de 80 cepas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* de fluconazol, voriconazol y posaconazol. 85

Tabla 18. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración fungicida mínima (CFM) en µg/mL de Fluconazol (FNZ), Voriconazol (VNZ) y Posaconazol (POS) de *Cryptococcus gattii** (N=30) y *C. neoformans* (N=50). 88

Tabla 19. Rango de Concentración mínima inhibitoria (CMI) al posaconazol, CMI 50% y 90%, media geométrica (MG) y porcentaje de concordancia entre el método de referencia (M27-A2) y Etest. 80 cepas evaluadas, *Cryptococcus neoformans* (N=50) y *C. gattii* (N=30). 90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Paloma común (*Columba livia*)..... 7

Figura 2: Células levaduriformes capsulares de *Cryptococcus*. A la derecha levaduras con gemación unipolar, a la izquierda levaduras con gemación multipolar. Preparación de tinta china objetivo 100x..... 13

Figura 3: Medio de cultivo SDA. Izquierda: *C. neoformans*, colonias cremosas. Derecha: *C. gattii*, colonias mucoides. 14

Figura 4: *Guizotia abyssinica*. Colonias de *Cryptococcus gattii* pigmentadas con color marrón.14

Figura 5: Levaduras capsuladas de *Cryptococcus gattii*, tinción de tinta china 15

Figura 6: Biopsias- cortes histológicos. Izquierda: coloración de Mucicarmín (100x), se observan estructuras levaduriformes color rojo. Derecha: Coloración de Gomori-Grocott (40x), se observan estructuras levaduriformes color negro..... 15

Figura 7: AUXACOLOR™2. Técnica comercial (BioRad®) para la identificación de levaduras, basada en el auxonograma, asimilación de azúcares. Germen identificado: *C. neoformans*. 16

Figura 8: Medio de cultivo CGB. El color azul corresponde a aislados de *C. gattii*, el color amarillo original del medio corresponde a cepas de *C. neoformans* sembradas. 17

Figura 9: Medio de cultivo Urea de Christensen..... 19

Figura 10: Lectura espectrofotométrica de la actividad ureasa de *Cryptococcus neoformans* (n=25) y *Cryptococcus gattii* (n=19). Punto de corte A=0,215: 76% de los aislamientos de *C. neoformans* y 15,8% de *C. gattii*, fueron clasificados como altos productores de urea. 47

Figura 11: Incremento de la actividad lacasa a lo largo del tiempo (0-120 min). A450nm 59

Figura 12: Extracción de ADN, se aprecia el precipitado color blanco al realizar extracción de ADN de las cepas de *Cryptococcus* y *Candida* evaluadas. 68

Figura 13: Electroforésis en gel de 0,8% agarosa. La flecha indica ADN, debajo se puede observar restos de ARN total. 69

Figura 14: Electroforésis en gel de 0,8% agarosa. Se observa ADN purificado sin restos de ARN. 69

Figura 15: Electroforésis en gel de 1% agarosa. Extracción de ARN.
P: Patrón de pares de bases 1Kbplus DNA ladder, 1:B46; 2:B50; 3:TIMM1315; 4:C24; 5:*C.krusei*. 72

Figura 16: Electroforésis en gel de 0,8% agarosa. Resultado de la PCR, se observa el fragmento de aproximadamente 500 pb solo en las cepas de los serotipos B y C. P: patrón de 100pb. 1-2: cepas de Serotipo A, 3-9 cepas de serotipo B, 10-12:serotipo C y 13-14:serotipo D. Control negativo 15:*Candida krusei*. Control positivo 12: TIMM1315..... 73

Figura 17: Secuencia enfrentada en *GenBank*. 74

Figura 18: Resultado de la RT-PCR. Electroforésis en gel de 1% agarosa. 75

ABREVIATURAS

5FC	5- fluorocitocina
AB	anfotericina B
ADN	ácido desoxirribonucleico
AF	antifúngico
AFLP	amplified fragments length polymorphism
AFST	antifungal susceptibility testing
ARN	ac.ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	lavado broncoalveolar
BC	British Columbia
BE	brote español
BLAST	Basic local Alignment Search Tool
CFM	concentración fungicida mínima
CGB	canavanina glicina azul de bromotimol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	concentración mínima inhibitoria
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EUCAST	european comité for antimicrobial Susceptibility testing
FNZ	fluconazol
HC	hemocultivo
IMIM	instituto de investigación médica
ITZ	itraconazol
LCR	líquido cefaloraquídeo
L-DOPA	L- dopamina
MIC	concentración mínima inhibitoria
NCBI	national center for Bitechnology information
NCCLS	National Committee fro Clinical Standards
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
POS	posaconazol
PRBB	Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona
R	resistente
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	transcriptasa reversa
S	sensible
SDA	Saboraud dextrosa agar
SDD	sensible dependiente de la dosis
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	sistema nervioso central
TARGA	tratamientos antiretrovirales de gran actividad
UE	unidad enzimática
UFC	unidades formadoras de colonias
URMIM	unitat recerca en malalties infeccioses i micologia
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
VNZ	voriconazol



Introducción



1 Introducción

La criptococosis es una infección exógena, cosmopolita de evolución subaguda o crónica tradicionalmente considerada como oportunista. Este hecho se confirmó rotundamente con la aparición del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), a partir de la cual se registró un aumento espectacular de casos de criptococosis. Esta enfermedad infecciosa es producida por levaduras ambientales del género *Cryptococcus*.

Los factores de patogenicidad de estas levaduras son muy diversos, entre ellos se pueden nombrar ciertas proteínas con actividad enzimática, estructuras polisacáridas que recubren la levadura, la capacidad de adhesión y el tropismo por el sistema nervioso central (SNC).

A pesar de que la criptococosis es una patología que afecta principalmente a pacientes con deficiencias en su sistema inmunológico, sobre todo a los infectados por el VIH, con bajo nivel de linfocitos T CD4. En estos enfermos, causa una meningitis o meningoencefalitis, de curso mortal sino se efectúa tratamiento, y a pesar de él, en algunas series más del 50% también fallecen.

Debido al mal pronóstico que presenta esta infección, son muchos los estudios realizados en *Cryptococcus*, donde se investiga la actividad antifúngica de los antimicóticos comúnmente utilizados en la práctica clínica. El objetivo es optimizar la terapia y establecer, si es necesario, una profilaxis efectiva contra la criptococosis, sobretodo en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular, el genoma de *Cryptococcus neoformans* esta siendo estudiado, y de hecho, existen genes completamente identificados que están relacionados con los factores de patogenicidad que las levaduras de este género poseen. Una vez identificados estos genes, se intenta construir secuencias completas o parciales con la finalidad de poder estudiar la función de las proteínas que sintetiza.

A lo largo de los años, se han ido reportando casos de esta micosis en sujetos inmunocompetentes, así como también se han realizado muestreos microbiológicos del medioambiente, para tratar de localizar los nichos ecológicos de esta levadura y

así poder precisar cuales especies o variedades son realmente patógenas para el hombre y los animales.

Actualmente, se acepta de que dos especies diferentes de *Cryptococcus* producen la patología en sujetos inmunosuprimidos (*C. neoformans*) e inmunocompetentes (*C. gattii*), pero la mayoría de las publicaciones, no hacen distinción si se trata de una especie u otra, por lo tanto la información que existe sobre el antiguo biotipo y actual especie *C. gattii* no es tan amplia y detallada como la que hay para la especie *C. neoformans*.

Cuanto mas información se obtenga de *C. gattii*, mejores estrategias terapéuticas se podrán desarrollar para poder combatir esta enfermedad.

1.1 Antecedentes

La primera descripción de criptococosis fue realizada por dos médicos alemanes O. Busse y A. Busche en 1894, que describieron una lesión de tipo sarcomatoso, en la tibia de un paciente femenino de 31 años, de donde se aislaron levaduras (1). Un año mas tarde, F. Sanfelice en Italia, describió una levadura capsulada, aislada del zumo de melocotón y que producía lesiones al inocularse en animales y a la que llamó *Saccharomyces neoformans*. No fue hasta 1901, que el científico J. P. Vuillemin, observó ausencia de fermentación de azúcares y sugirió la reclasificación de esta levadura dentro del Género *Cryptococcus*.

En 1916, Stoddler y Cuttler, describieron aspectos clínicos de la enfermedad y propusieron la utilización del nombre *Torula hystolitica*, nombre que fue usado por un largo período de tiempo.

En 1935, finalmente, Rhoda Benham, de Estados Unidos, estudió los caracteres morfológicos, serológicos, taxonómicos de mas de 40 cepas de levaduras que incluían las originales aisladas por F. Sanfelice y O. Busse, y concluyó que todos los aislamientos humanos correspondían a la misma especie y propuso asignarle de nuevo la nomenclatura utilizada por J.P Vuillemin, *Cryptococcus neoformans* (2).

E. Evans en 1950 (3), de la Universidad de Los Angeles en California, continuando con los estudios pioneros de R. Benham halló diferencias antigénicas del mucopolisacárido

capsular, que le permitió agrupar las cepas de *Cryptococcus neoformans* en 3 serotipos (A, B y C). Luego, 20 años mas tarde, Wilson y colaboradores identificaron el serotipo D (4).

En cuanto al hallazgo de *C. neoformans* en el medio ambiente, en 1951, C. W. Emmons realizó el aislamiento de este hongo directamente de la tierra, así como de nidos y excretas de palomas (5). A partir de 1970, se comenzó a hacer diferencias en cuanto a la morfología, bioquímica, serología y epidemiología de las variedades de *Cryptococcus*, ya que en ese año el médico F. Gatti obtuvo el aislamiento de una levadura, en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un niño con meningitis en el Zaire (6) y que Vanbreuseghem consideró como una biovariedad o biotipo y propuso la denominación de *Cryptococcus neoformans var. gattii* (7), la cual fue aceptada hasta el año 2002.

Un gran avance en el conocimiento de *Cryptococcus neoformans*, se produjo en 1975 cuando K.J. Kwon-Chung, descubrió la reproducción sexual de esta levadura. Mediante cruces de cepas compatibles “*mating*” α y α se produjeron los basidiomicetos de la fase teleomorfa, por lo que se clasificó dentro del Género *Fillobasidiella* (8).

También en la década de los 80, K. J. Kwon-Chung, gran investigadora de esta levadura, realizó hallazgos de gran interés en varios tópicos de las variedades de *Cryptococcus*. Al estudiar la actividad enzimática de la fenoloxidasas, enzima encargada de producir la melanina en *Cryptococcus*, reportó la existencia de cepas mutantes no productoras de melanina que tenían menos virulencia en modelos animales experimentales (9), indicando la importancia de ésta enzima como factor de patogenicidad. Realizó estudios ambientales en donde se indicaba la posible existencia de diferencias epidemiológicas de los serotipos de *Cryptococcus* (10), así como también investigó las características bioquímicas de la ureasa (11), enzima clave para la identificación en el laboratorio de *Cryptococcus*. En éste trabajo evidenció que el efecto inhibitor del agente quelante EDTA, era variable según que variedad se estudiaba.

En vista de los antecedentes que indican diferencias epidemiológicas, morfológicas y bioquímicas de los serotipos y variedades de *Cryptococcus neoformans*, los estudios continuaron y en 1990; los autores Ellis y Pfeiffer, luego de realizar muestreos ambientales en Australia, propusieron que el nicho ecológico de la variedad *gattii*

podía ser la madera y otras partes de determinadas especies de árboles (*Eucalyptus calmadulensis* y *E. tereticornis*) (12).

A partir del año 2000, se comenzó a estudiar ambas especies por separado, gracias a la propuesta realizada por parte de Kwon-Chung en el año 2002 (13), de separar filogenéticamente al *Cryptococcus* var. *gattii*, ambos serotipos (B y C); en una especie diferente al *C. neoformans* serotipos A y D; conservando el nombre de *C. gattii* en lugar de otros que habían sido sugeridos con anterioridad.

1.2 Taxonomía

La clasificación convencional de los hongos se basa en las características de la reproducción sexual y asexual. Específicamente, las levaduras se clasifican en *Ascomycetes* si son formadoras de ascosporas, *Basidiomycetes* al presentar basidiosporas y en *Deuteromycetes* u hongos imperfectos a los que no se conoce la reproducción sexuada. En este grupo también se incluye la fase anamorfa de la forma sexuada.

Los estados perfectos o teleomorfos de *Cryptococcus neoformans* se denominan *Filobasidiella neoformans* para los serotipos A y D (8), y *Filobasidiella bacillispora* para los serotipos B y C (14). *Filobasidiella neoformans* produce basidiosporas de forma globosa u ovalada con paredes rugosas, en cambio *F. bacillispora* las presenta con paredes lisas (15).

En 1981, se estudió la relación genética de *F. neoformans* y *F. bacillispora*, comparando el porcentaje de homología inter e intraespecífica que presentaba el ADN de ambas. Se observó que había aproximadamente un 55% a 60% de homología entre los aislados de ambas especies frente a un 88 a 95% de homología entre los aislados de la misma especie (16).

Boekhout *et al* en el 2001 (17), utilizó la técnica de AFLP (siglas en inglés de *Amplified Fragments Length Polymorphism*), que consiste en la combinación de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos en el genotipo. Estas diferencias son registradas como patrones variables en número y tamaño del número de bandas generadas. Estos autores evaluaron el polimorfismo del genotipo de aislados de *C. neoformans* var

grubii (serotipo A), *C. neoformans* var *neoformans* (serotipo D) y *C. neoformans* serotipo B. En base a ello, obtuvieron un árbol secuencial en donde se distinguen dos ramas que corresponden a dos agrupaciones con genotipos diferentes de *C. neoformans* y *C. bacillisporus* (*C. neoformans* var *gattii*).

Finalmente, de acuerdo a todas estas propuestas establecidas, se considera que existen al menos dos especies patogénicas de *Cryptococcus* (Tabla 1) y cinco serotipos, el serotipo A, B, C, D y AD. Este último serotipo es considerado hasta ahora un híbrido entre los serotipos A y D.

Género	especie	Variedad	serotipo
<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>	<i>grubii</i>	A
<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>	<i>neoformans</i>	D
<i>Cryptococcus</i>	<i>gattii</i>	-	B
<i>Cryptococcus</i>	<i>gattii</i>	-	C
<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>		AD

Tabla 1: *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. Variedades y serotipos.

Entre ellas se encuentra, *C. neoformans* con dos variedades: var *grubii* (serotipo A), var *neoformans* (serotipo D) cuya forma sexual (Fase teleomorfa) corresponde a la *Filobasidiella neoformans* (Tabla 2); y la otra especie sería *C. bacillisporus* (sinónimo de *C. neoformans* var. *gattii*, serotipos B y C) cuya forma sexual es *F. bacillisporus*. Estos autores también señalan que ambas especies, pueden presentar 2 genotipos que difieren en su distribución ecológica y geográfica.

La clasificación taxonómica basada en los estudios anteriores y en los análisis de las secuencias de nucleótidos del RNA ribosomal de *F. neoformans* realizada en 1993 por E Gueho, fue la siguiente (18):

	Fase anamorfa	Fase teleomorfa
Phylum	<i>Deuteromycetes</i>	<i>Basidiomycota</i>
Orden	<i>Cryptococcales</i>	<i>Filobasidiales</i>
Familia	<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Filobasidiaceae</i>
Género	<i>Cryptococcus</i>	<i>Filobasidiella</i>
Especie	<i>neoformans</i>	<i>Neoformans</i>
Variedad	<i>neoformans</i>	<i>Neoformans</i>
	<i>gattii</i>	<i>Bacillisporus</i>

Tabla 2: *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. Fase anamorfa (forma asexual) y fase teleomorfa (forma sexual). (18)

A partir de ese año, se realizaron diversos trabajos enfocados en la reclasificación de los diferentes serotipos de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Franzot *et al* en 1998, mediante la determinación de la secuencia del gen URA5 evidenció diferencias filogenéticas en ambos serotipos A y D (19). Finalmente, propusieron la separación de los serotipos A y D de *C. neoformans* var. *neoformans*; en las variedades *grubii* y *neoformans*, respectivamente (20).

A través de diversos estudios de los genes URA5, CNLAC1, CAP59, CAP64, JGS y ITS rRNA, así como del DNA, se pudo demostrar que al construir el árbol filogenético de *C. neoformans* var. *gattii* y *C. neoformans* var. *neoformans* (21-25), ambas variedades tenían claramente dos taxones monofiléticos divergentes. Estos resultados indicaron, que las dos variedades son suficientemente distintas y pueden ser reconocidas como especies separadas (13).

Diversos estudios reconocen que existe un serotipo AD de *Cryptococcus neoformans*, que presentaría en el mucopolisacárido capsular antígenos tanto del serotipo A como del serotipo D. Xu *et al* (26) propusieron diferentes hipótesis del origen de éste 5º serotipo AD de *Cryptococcus neoformans*, la primera de ellas propone que las cepas serotipo AD son células ancestrales que presentan diferencias moleculares comparables pero separadas de los otros serotipos de *C. neoformans*. La segunda hipótesis sugiere que el híbrido serotipo AD tiene un ancestro común resultante de la hibridación de los serotipos por separado, y que el resultado de este proceso ha creado múltiples mutaciones que hacen que las secuencias de DNA analizadas de cepas serotipo AD sean diferentes. La tercera hipótesis se refiere a la obtención de éste híbrido más recientemente, producto del intercambio genético de cepas de serotipos A y D. Y como cuarta hipótesis, indican que la presencia de esta cepa híbrida se debe a múltiples hibridaciones ocurridas en la célula ancestral hasta la actualidad.

1.3 Epidemiología de la criptococosis

La criptococosis es adquirida fundamentalmente por inhalación de las células levaduriformes o según han sugerido varios autores por basidiosporas. La infección pulmonar primaria es frecuentemente asintomática y puede ser contenida y erradicada dentro de un granuloma. Sin embargo, dependiendo de los factores del huésped, el

tamaño del inóculo y posiblemente la virulencia de la cepa; el microorganismo puede diseminarse de forma aguda o luego de un período de latencia a sitios extrapulmonares, teniendo particular predilección por el SNC (27).

Se han descrito casos clínicos ocasionados por otras especies como *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii*, compatibles con criptococosis cutánea, de cornea, pulmonar, renal; en donde solo se han aislado éstas levaduras. Las infecciones que se han producidos por *C. albidus* han ocurrido en humanos con deficiencias en su sistema inmune, así como también en animales (28-32). Los casos clínicos descritos de *C. laurentii* se han producido solo en humanos y presentaron resistencias al tratamiento con antifúngicos (33-37).

Los datos disponibles demuestran que *C. neoformans* var. *grubii* es la especie más comúnmente aislada de enfermos inmunodeprimidos con criptococosis (38), no obstante la variedad *neoformans* (serotipo D) puede tener una prevalencia elevada con respecto al serotipo A, en algunas áreas geográficas, como por ejemplo en Estados Unidos (New York City) (39). Asimismo la var. *grubii*, es la que se aísla más frecuentemente de muestras ambientales, ya que tiene predilección por suelos contaminados con excrementos de aves, especialmente de palomas comunes (*Columba livia domestica*) (Figura 1) (5).



Figura 1: Paloma común (*Columba livia*).

Inicialmente se consideró que *C. gattii* presentaba una distribución geográfica muy restringida, pero a lo largo de los años, se ha aislado de muestras ambientales de suelo y árboles, y se ha sugerido que su nicho ecológico está estrechamente relacionado con los árboles de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) (12). Se ha

podido encontrar como agente causal de criptococosis tanto en animales y humanos, en diferentes zonas del mundo, incluyendo España (40-42). Y cada vez se describen más casos de criptococosis producidas por esta especie, que se van distribuyendo en zonas donde antes no había sido descrito. Upton *et al* (43) muy recientemente, describieron el primer caso de criptococosis causada por *C. gattii*, en un paciente masculino leucémico residente de Washington D.C sin antecedentes descrito de haber viajado fuera de su zona residencial.

La criptococosis por *C. gattii* se ha considerado una micosis o patología de países tropicales (10), debido a que la mayoría de los casos se han registrado en países con clima tropical. Los casos clínicos descritos fuera de éstas zonas se consideran casos excepcionales, y siempre se trata de establecer relaciones entre el paciente o el ambiente que lo rodea, con algún elemento “importado”, viaje o traslado de un país tropical.

Cuando el número de casos de criptococosis localizados en países de clima templado aumenta en un período corto de tiempo, es necesario considerar la alerta epidemiológica. Tal fue el caso en 1999, en La isla de Vancouver, British Columbia (BC) en Canadá (44), donde ocurrió un brote muy importante de criptococosis específicamente por *C. gattii*. La mayoría de los humanos y animales infectados eran inmunocompetentes, y debido a ello, la institución gubernamental *British Columbia Centre for Disease Control* en junio de 2002, advirtió al público y al personal sanitario de ésta zona acerca del riesgo potencial de enfermedad al cual estaban expuestos. A partir de entonces, en BC, la criptococosis es una enfermedad de notificación obligada a las autoridades sanitarias.

La patología producida por *C. gattii*, se asemeja en muchos casos a la producida por los hongos patógenos primarios, puesto que afecta a personas y animales inmunocompetentes (45). Antes de la aparición de la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la criptococosis ocurría esporádicamente tanto en hombres como en animales en todo el mundo. A principios de la década de 1980, por la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) un incremento de la adquisición de la criptococosis se produjo en éste tipo de pacientes. Hasta 1998, la criptococosis fue considerada la cuarta causa de muerte en pacientes con SIDA (46) y afortunadamente con el desarrollo y aplicación de las terapias inhibitoras de la proteasa y los tratamientos antiretrovirales de gran actividad (TARGA), se ha reducido

en países desarrollados, significativamente la tasa de infección por *Cryptococcus* y otros microorganismos oportunistas (47).

1.4 La Criptococosis: Cuadros Clínicos

1.4.1 Criptococosis pulmonar

La principal vía de entrada de las levaduras y eventualmente basidiosporas ambientales de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* es la vía respiratoria. La inhalación de las esporas fúngicas ocasiona una primoinfección pulmonar. La criptococosis pulmonar suele ser asintomática o en todo caso, ocasiona síntomas inespecíficos que dificultan el diagnóstico (48). En la mayoría de los casos puede presentarse con tos, fiebre, disnea, pérdida de peso y dolor pleurítico (49).

Debido al cuadro general inespecífico que produce, es preciso realizar un diagnóstico diferencial con la tuberculosis y otras patologías infecciosas (50). Esta primera etapa de primoinfección puede remitir espontáneamente o progresar dependiendo de la capacidad de resistencia del huésped.

Las lesiones pulmonares se pueden presentar en cualquier zona, y las imágenes radiológicas suelen ser también inespecíficas. Se observan infiltrados localizados, no muy extensos. Suelen ser lesiones pequeñas y por ello pasar desapercibidas en la radiografía simple de tórax, la mayoría curan sin dejar granulomas.

Dependiendo del tiempo de evolución de la infección, la virulencia de la cepa y del estado general del paciente, los tipos de criptococosis pulmonar se clasifican en cuatro categorías:

- a) En 1977, Fisher (51) observó un infiltrado mas amplio y difuso que pueden evolucionar a una neumonía intersticial bilateral.
- b) Lehmann en 1984 (52), describió el primer tipo de criptococosis pulmonar, bastante común y clásico. Describió la aparición de una zona infiltrada, solitaria y con frecuencia en el lóbulo superior, que con la evolución propia de la enfermedad podía simular un carcinoma, quiste hidatídico o absceso pulmonar.

- c) El tercer tipo fue descrito por McDonnell y Hutchins en 1985, (48), donde indicaron la presencia de infiltrados peribronquiales extensos, asemejándose a una tuberculosis activa, al menos por la imagen radiológica.
- d) Lozano en 1999 (53), describió la forma más evolucionada y mas parecida a la tuberculosis miliar que suele presentarse en pacientes con linfoma o leucemia. Observando pequeñas lesiones en todos los campos pulmonares que con el tiempo pueden llegar a granulomas. En este tipo de criptococosis pulmonar la enfermedad puede progresar y diseminarse.

El fuerte tropismo que tiene *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* por el SNC, hace que en cualquiera de los tipos de criptococosis pulmonar pueda llegar a diseminarse.

La criptococemia con aislamiento de ésta levadura en hemocultivos representa la manifestación mas clara de diseminación de la criptococosis asociada con un alto porcentaje de meningitis criptocócica (54).

Aunque *C. neoformans* no forma parte de la flora residente normal en el hombre, se ha comprobado que puede ser un colonizador transitorio del tracto respiratorio inferior y superior. Se ha visto en animales de experimentación la permanencia de *Cryptococcus neoformans* en el interior de macrófagos de tejido intestinal de criptococoma pulmonar por hasta 18 meses luego de controlar la infección (27). También se ha descrito como colonizador temporal en la próstata de pacientes que fueron tratados de criptococosis meníngea (55).

1.4.2 Criptococosis meníngea

La meningitis criptocócica es la forma de presentación más frecuente, constituyendo la máxima expresión del neurotropismo del hongo. Una de las razones aducidas para explicarlo, hace referencia a una ausencia de factores inhibidores del crecimiento en el liquido cefalorraquídeo (LCR) mientras que un segundo argumento supone la existencia en el tejido nervioso de factores nutricionales selectivos, tales como asparagina, que pueden funcionar como fuente de nitrógeno y estimular el crecimiento del *C. neoformans* (56). No se ha esclarecido totalmente la razón de este tropismo tan marcado por el SNC, se cree que *C. neoformans* puede escapar del sistema inmunitario del huésped en el LCR, debido a la baja tasa de unión de la fracción C3 del sistema de complemento a la superficie de la cápsula (57). La baja concentración de glucosa presente en las meninges también puede favorecer el tropismo por el SNC,

ya que se ha demostrado que altas concentraciones de glucosa inhiben la acción de la enzima fenoloxidasa también llamada lacasa de *Cryptococcus* (58). La acción de ésta enzima protege a las células fúngicas contra ciertas sustancias oxidantes como los rayos UV que suelen tener efecto fungicida (59) así como también sirve de protección contra algunos antifúngicos, como la AB (60).

En los enfermos de SIDA con meningitis criptocócica el LCR puede ser de apariencia normal sin ninguna alteración importante. El aspecto puede ser claro, con hiperproteinorrea variable y disminución ligera de la glucosa. Si se observan células, principalmente serán linfocitos. El número de criptococos presentes en el LCR es variable. Se visualizan en el sedimento mezclado con tinta china, evidenciando la presencia de la cápsula.

En ciertos casos se han descrito meningitis criptocócica purulenta, que recuerda una meningitis bacteriana, con aspecto turbio del LCR y recuento celular elevado y predominio de neutrófilos (61). En estos casos los pacientes suelen tener alguna patología hepática, renal o enfermedad de Hodgkin. En cualquiera de los casos el diagnóstico definitivo se obtiene con el cultivo, aislamiento e identificación del microorganismo.

La apariencia macroscópica de las meninges puede ser casi normal pero habitualmente se describe un aspecto reluciente o edematoso, así como, una ocupación del espacio subaracnoideo por un material mucoide o gelatinoso que puede propagarse también por los espacios de Virchow-Robin, distendiéndolos hasta determinar una transformación pseudo-microquística de los mismos.

La evolución a meningoencefalitis es poco frecuente (62) y en caso de ocurrir, se trata de una infección agresiva, de curso muy rápido y fulminante (63).

Otra patología que puede afectar al SNC es el desarrollo de tumoraciones llamadas criptococoma cerebral. Son pocos los casos reportados, y al parecer suele ocurrir en sujetos inmunocompetentes (64), se trata de una masa granulomatosa de curso crónico que puede producir signos y síntomas de hipertensión craneal como náuseas, vómitos, cefaleas, diplopía y hemiparesias. Algunos pacientes sufren de cambios de personalidad y somnolencia, así como trastornos mentales, alucinaciones, irritabilidad, confusión, llegando a sufrir incluso ataques epilépticos (65). Debido a la expansión del criptococoma, se puede llegar a producir hemiparesía y hemiplejía.

Para realizar el diagnóstico temprano de la criptococosis meníngea además de las técnicas micológicas clásicas, examen microscópico y cultivo, se han utilizado diversas técnicas. Las pruebas serológicas para detectar anticuerpos no han sido efectivas, ya que la cápsula dificulta que exista una gran producción de inmunoglobulinas específicas durante la infección (27). Por otro lado, los polisacáridos criptocócicos se pueden detectar en el LCR en casos de infección temprana (66). Para su determinación, existen pruebas inmunológicas, comerciales y no comerciales que pueden ser utilizadas en el laboratorio para determinar el título de estos antígenos capsulares, tanto en suero como en LCR usando una simple aglutinación de látex con anticuerpos policlonales o monoclonales contra los componentes capsulares (67).

1.4.3 Criptococosis cutánea

En 1894, se describe el primer caso de criptococosis con localización cutánea, por Busse y Buschke en un hombre con lesiones en la piel, infecciones óseas y enfermedad generalizada. La afectación cutánea se ha descrito con mayor frecuencia en enfermos de SIDA. Las lesiones se pueden presentar como vesículas o abscesos que luego se ulceran, también con aspecto maculopapular y pustulosas. Pueden presentarse junto con las lesiones signos y síntomas como cefalea, vómitos de hasta 3 semanas de duración, e incluso diarrea. La cara y el cuello son las zonas mas afectadas, pero también pueden aparecer en la región torácica. Si se cultivan las lesiones, se puede obtener el aislamiento del *Cryptococcus* (68), aunque en solo 5-15% de los pacientes se ha llegado a confirmar (69).

Las lesiones que se distribuye en cara y cuello pueden simular otras enfermedades dermatológicas, como por ejemplo el carcinoma basocelular, paracoccidioidomicosis e histoplasmosis diseminada y *molluscum contagiosum* (70).

A pesar de que la mayoría de los casos descritos de criptococosis cutánea son a causa de una diseminación hematógena criptocócica, se han visto casos en donde se describen infecciones cutáneas primarias incluso sin antecedentes de inmunosupresión (71).

1.4.4 Otras localizaciones de la criptococosis

A pesar del fuerte tropismo que tiene *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* por el sistema nervioso central (SNC), se pueden presentar micosis profundas con otras localizaciones poco usuales. Se han descritos casos de abscesos en hueso y osteomielitis (72), criptococosis palpebral (73), del tracto genital y del sistema urinario (74,75). Recientemente, Vawda *et al*, describieron un caso inusual de criptococosis diseminada a mediastino ocurrida posteriormente a una criptococosis pulmonar primaria (76).

1.5 Agentes Etiológicos: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*

1.5.1 Características generales

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* por lo general presentan ambas formas de levadura esférica, ovoide y a veces de forma alargada, con gemación unipolar o multipolar (Figura 2). Crecen bien a 37°C en los medios de cultivo habituales de micología, como el de agar Sabouraud dextrosa (SDA) y no forman pseudomicelio.



Figura 2: Células levaduriformes capsulares de *Cryptococcus*. A la derecha levaduras con gemación unipolar, a la izquierda levaduras con gemación multipolar. Preparación de tinta china objetivo 100x.

Ciertas características morfológicas se asocian especialmente con cada una de las dos especies. Las colonias de *C. gattii* crecen sobre los medios convencionales generalmente mas mucosas y más húmedas que las colonias de *C. neoformans* (Figura 3). Se ha descrito que el pigmento de color marrón producido por las colonias de *C. gattii* sobre el medio de cultivo de semillas de *Guizotia abyssinica* (Figura 4) es

menos intenso que el de *C. neoformans* (15) y en cuanto a la forma que presentan las levaduras de *C. gattii* se describen ligeramente mas elípticas (77).



Figura 3: Medio de cultivo SDA. Izquierda: *C. neoformans*, colonias cremosas. Derecha: *C. gattii*, colonias mucoides.

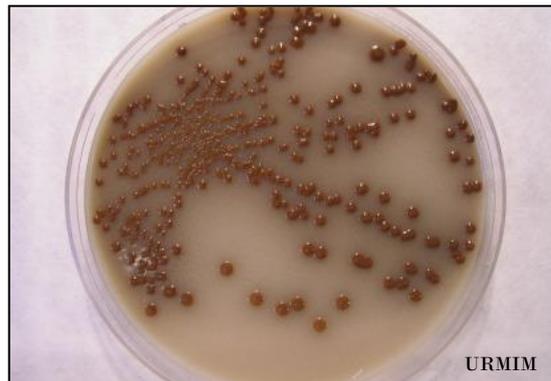


Figura 4: *Guizotia abyssinica*. Colonias de *Cryptococcus gattii* pigmentadas con color marrón.

Las cepas de *C. neoformans* y *C. gattii*, presentan una cápsula mucopolisacárida que le confiere aspecto macroscópico mucoide, cremoso y color blanco amarillento a las colonias crecidas en medios de cultivo SDA (Figura 3). Esta cápsula en el huésped infectado puede llegar a ser muy voluminosa con un diámetro mayor que el de la propia levadura (3,5-7 x 3,5-8 μm). En cambio en cultivo, y luego de realizar varias resiembras de la misma cepa en medio de Sabouraud, la cápsula disminuye su tamaño y puede llegar a perderse.

La cápsula polisacárida no se tiñe con los colorantes habituales de microbiología, como el Gram o el Giemsa, por el contrario, se evidencia por contraste negativo, como

un espacio claro alrededor de la célula levaduriforme. El líquido de montaje mas utilizado para este fin es la tinta china (Figura 5), que permite la visualización con contraste oscuro sobre el que destaca la célula con su cápsula. Si se dispone de ellas, la tinción de mucicarmín permite la tinción de los mucopolisacáridos y la de Gomori-Grocott que tiñe la pared celular (Figura 6) también son de gran utilidad (78).

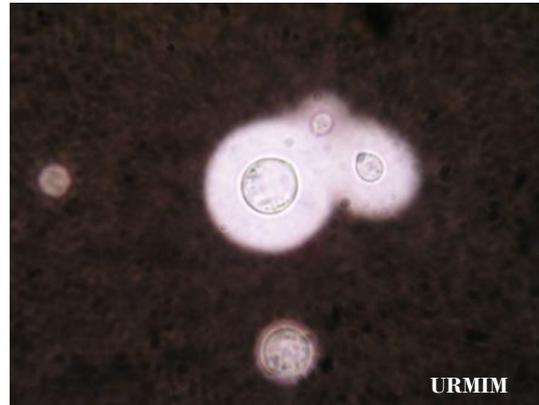


Figura 5: Levaduras capsuladas de *Cryptococcus gattii*, tinción de tinta china

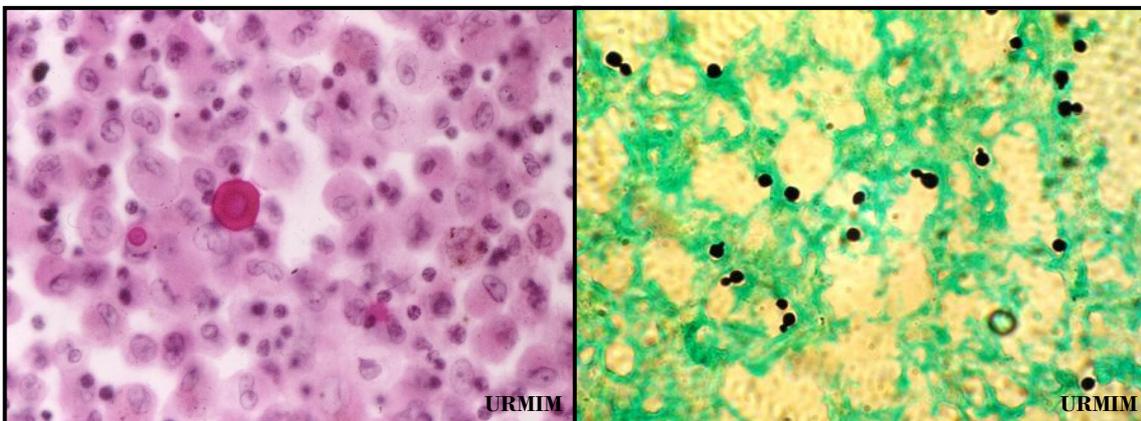


Figura 6: Biopsias- cortes histológicos. Izquierda: coloración de Mucicarmín (100x), se observan estructuras levaduriformes color rojo. Derecha: Coloración de Gomori-Grocott (40x), se observan estructuras levaduriformes color negro.

1.5.2 Identificación y serotipado

Una de las técnicas mas conocidas por diversidad de autores, utilizada para la serotipificación de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, es la prueba de “*Crypto Check latron*” (Iatron Laboratorios Inc., Co. 1-11-4 Higashi-Kanda. Chiyoda-ku, Tokio 101, Japan), en donde mediante aglutinación con partículas de látex recubiertas con antígenos de *Cryptococcus* se puede conocer el serotipo correspondiente.

Lamentablemente, estos reactivos no se encuentran disponibles hoy día para su uso comercial, no obstante algunos autores han producido sus propios antisueros policlonales en conejos (79).

Ambas especies de *Cryptococcus*, poseen características generales comunes que no permiten identificar cada especie por separado en un laboratorio de rutina. Ambas especies son ureasa positivo al sembrarlas en medio de urea de Christensen, poseen cápsula que se evidencia con la tinta china y si se aplica alguna técnica de identificación comercial de levaduras como por ejemplo *Auxacolor 2™ colorimetric system®* (BioRad, Marmes-la-Coquette, France) o el Sistema *API 20C AUX Clinical Yeast System* (bioMerieux Vitek, Hazelwood, Mo.), el resultado que se obtiene para las dos especies, es el mismo, *Cryptococcus neoformans* (Figura 7).



Figura 7: AUXACOLOR™2. Técnica comercial (BioRad®) para la identificación de levaduras, basada en el auxonograma, asimilación de azúcares. Germen identificado: *C. neoformans*.

Existen varias formas de identificar a nivel de especie *C. neoformans* y *C. gattii*. Una de ellas es a través de la capacidad de crecimiento en medio enriquecido con canavanina y glicina (80). El medio de cultivo CGB, llamado así por presentar en su composición *Canavanine-Glycine-Bromotymol blue*. *Cryptococcus gattii*, a diferencia de *C. neoformans*, es capaz de utilizar la glicina como única fuente de carbono, además siendo resistente a la canavanina, crece en éste medio de cultivo, produciendo la alcalinización del medio, lo cual se evidencia con la aparición del color azul intenso (Figura 8). Esta alcalinización resulta de la liberación de amonio durante la degradación de la glicina (81). Otra forma tradicional de identificar a *C. neoformans* y *C. gattii*, es a través de la asimilación de D-prolina y D-triptófano. *C. gattii* utiliza ambos aminoácidos como fuente de nitrógeno (82).

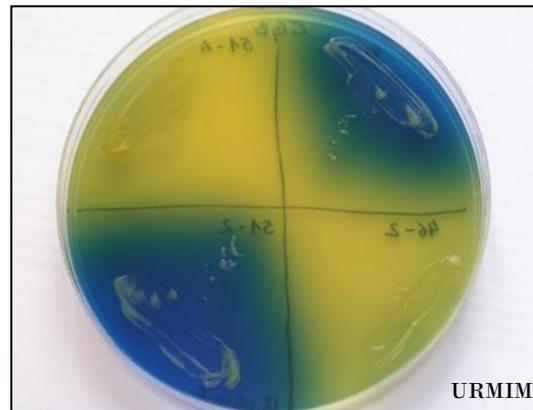


Figura 8: Medio de cultivo CGB. El color azul corresponde a aislados de *C. gattii*, el color amarillo original del medio corresponde a cepas de *C. neoformans* sembradas.

Mediante técnicas de biología molecular y genotipificación, también se puede realizar la identificación de especies de levaduras de *Cryptococcus*. Se ha comentado anteriormente el trabajo realizado por Boekhout en 2001 (17), en donde utilizando la AFLP se identificaron las especies *C. neoformans* y *C. bacillisporus*. También existen otros trabajos más recientes como el de Ito-Kuwa *et al* (83) en donde logran identificarlos serotipos de ambas especies mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.5.3 Factores de patogenicidad

Entre los factores que se consideran responsables del poder patógeno de *Cryptococcus* se encuentran la cápsula, la capacidad de adherencia (38) y las proteínas con actividad enzimática, como las proteinasas (84), las fosfolipasas (85), la fenoloxidasa (86) y la ureasa (57).

1.5.3.1 Cápsula

La cápsula de *C. neoformans* es un polisacárido compuesto principalmente por xilosa, manosa y ácido glucurónico. Esta composición particular de la cápsula de *Cryptococcus* lo distingue de otros hongos de interés clínico, ya que no contiene almidón, glicógeno, ni sulfato de mucoína (1). Por el contrario, contiene gran variación en la estructura polisacárida, produciendo diferentes reacciones antigénicas y en base

a ello, las cepas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* se dividen en 4 serotipos A, D y B, C, respectivamente.

Mediante gran variedad de técnicas se puede visualizar la presencia de la cápsula con aplicación de tinción de tinta china, reacciones inmunológicas (inmunofluorescencia) y microscopía electrónica. La cápsula se encuentra inmediatamente fuera de la pared celular, las uniones bioquímicas que las mantienen unidas no se conocen completamente, pero se piensa que se trata de uniones no covalentes. El tamaño puede ser variable desde $<1\mu\text{m}$ a $>50\mu\text{m}$ de diámetro, dependiendo de la cepa, medioambiente y las condiciones de crecimiento (38). En el huésped infectado, las cepas de *Cryptococcus neoformans* presentan una cápsula que puede ser muy voluminosa con un diámetro varias veces mayor que el de la misma célula (Figura 5). Al realizar cultivos sucesivos de las cepas, la cápsula puede reducir su tamaño e incluso puede llegar a perderse.

Se conoce que la cápsula es un factor de patogenicidad importante para la virulencia de cepas de *C. neoformans*; ya que se ha demostrado que bloqueando los diversos genes que intervienen en su síntesis, se pueden obtener *in vitro* aislados acapsulares avirulentos para modelos murino (87).

1.5.3.2 Ureasa

Es una níquel-metaloenzima cuya función es catalizar la hidrólisis de la urea a amonio y carbamato. La actividad ureasa se utiliza rutinariamente como una prueba de identificación de esta levadura mediante el medio de ureasa de Christensen (88) (Figura 9) y de algunos otros hongos patógenos, como dermatofitos (*T. mentagrophytes*). Como factor de patogenicidad en el desarrollo de la criptococosis meníngea, se ha descrito que la ureasa puede contribuir al paso de estas levaduras a través de la barrera hematoencefálica (89).



Figura 9: Medio de cultivo Urea de Christensen.

Olszewski *et al* (90), estudiaron el posible poder patógeno de la ureasa, al comprobar *in vivo* que la diseminación del *Cryptococcus* (H99-ureasa+) hacia el cerebro, ocurría acompañado de secuestro masivo de levaduras por la vía de los microcapilares y que por el contrario no ocurrió en el grupo de animales inoculados con la cepa *knockout* ureasa (-).

Ocasionalmente se han descrito cepas de *Cryptococcus neoformans* no productoras de ésta enzima (91) pero la gran mayoría dan positiva en la prueba de la ureasa de Christensen (88). Kwon-Chung *et al* (11) en 1987 describieron como un fenómeno diferencial de la variedad *gattii*, la supresión de la actividad ureasa por efecto del agente quelante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Pero hasta ahora, no existen publicaciones que describan diferencias cuantitativas en la producción de ureasa por *C. gattii*.

1.5.3.3 Lacasa

Otro factor de patogenicidad atribuido a *Cryptococcus neoformans* que se ha considerado de gran importancia, es la capacidad de producir melanina debida a la actividad enzimática de la lacasa (fenoloxidasa), esta enzima también se ha descrito en otros hongos patogénicos del género de *Histoplasma*, *Blastomyces* y *Sporothrix* (92). La melanina se produce en presencia de compuestos dihidroxifenólicos o poliaminobencénicos, de oxígeno molecular y en condiciones de bajo contenido de glucosa. La lacasa del género *Cryptococcus* se encuentra unida a la pared celular (93) y a la melanina resultante de su actividad se le atribuyen efectos de protección contra

los antioxidantes, dando soporte a la integridad de la pared celular, protección frente a temperaturas extremas, interferencia con la fagocitosis mediada por anticuerpos y con la respuesta de los linfocitos T (38,94).

También se le ha considerado una defensa contra diversas proteínas microbidas (86) y se le ha atribuido una reducción en la sensibilidad a algunos antifúngicos como anfotericina B y caspofungina (95). La síntesis de la lacasa está regulada genéticamente habiéndose demostrado la participación del gen CNLAC1 (96), y más recientemente de otros 5 genes adicionales, Ccc2, Atx1, Chs3, Mbf1 y Snf5 (97).

1.6 Genoma de *Cryptococcus*

Utilizando técnicas innovadoras de biología molecular aplicadas al área de genética microbiana y patogénesis, en 1999, se inició el proyecto de un gran grupo de investigadores para secuenciar el genoma de *Cryptococcus neoformans* (98). El objetivo de éste proyecto es obtener la secuencia completa del genoma de al menos dos y posiblemente cuatro cepas que representen la mayoría de los serotipos/variedades/especies de éste organismo.

Este proyecto de genoma de *C. neoformans* ha realizado grandes avances, construyendo librerías genómicas de cepas de referencia del serotipo A (H99/125.91), del serotipo D (JEC20/JEC21) y del serotipo B (WM276/E566), permitiendo que ésta información sea accesible para poder utilizarla en investigación de genómica y proteómica.

Los trabajos mas recientes acerca del genoma de este basidiomiceto, ha sido realizado por Loftus *et al* en 2005 (99). Estos autores describen que el genoma de *Cryptococcus neoformans* tiene aproximadamente 20 megabases de longitud, organizados en 14 cromosomas y con abundantes intrones en sus genes, aproximadamente 6500. El estudio profundo de la secuencia del genoma de *Cryptococcus neoformans* será de mucha utilidad para el conocimiento de la biología y patogenicidad de los basidiomicetos, los cuales pueden permitir el desarrollo de estrategias moleculares en modelos animales para identificar y caracterizar blancos potenciales para las drogas antifúngicas del futuro.

Los genes que despiertan mayor interés para ser utilizados como modelos marcadores de la patogenicidad, son aquellos que se encuentran relacionados con los factores de virulencia de *Cryptococcus*. Estos genes se pueden dividir en dos grupos (100):

-Factores genéticos de regiones conservadas (no esenciales):

El gen *CNLAC1*, *CNA1* (calcineurin A), el *GPA1* (subunidad α de la proteína G) y el *STE12 α* (interviene en expresión del *mating type*).

-Factores genéticos *Cryptococcus*-específicos:

Entre ellos se encuentran los 4 genes capsulares *CAP59*, *CAP64*, *CAP60* y *CAP10*.

1.6.1 Gen *CNLAC1*

Gracias a las técnicas de biología molecular, en 1994, se realizaron varios estudios relacionados con el genoma y los genes de los 4 serotipos de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, que para ese entonces considerada una variedad.

Wikes *et al* en 1994, definieron la localización cromosómica de 10 genes, entre ellos el *CNLAC1* (101). P.R. Williamson, en el mismo año, identificó la enzima fenoloxidasa del *Cryptococcus neoformans* como una lacasa, tanto a nivel bioquímico como molecular (96), en su trabajo este autor, clonó y secuenció este gen utilizando una cepa de *Cryptococcus neoformans* serotipo D. Describe que el gen de la lacasa esta formado por una región simple que codifica a una estructura polipeptídica de 624 aminoácidos de longitud y que contiene 14 intrones con longitudes variables desde 52 hasta 340 pares de bases (pb).

El gen de la lacasa es una región conservada en muchos hongos ascomicetos y basidiomicetos. Estudios genéticos sugieren que la síntesis de la melanina mediada por la enzima lacasa, es un factor de virulencia de las cepas de *Cryptococcus*. Estudios realizados *in vivo*, en modelos animales donde se ha interrumpido completamente o *knock-out* el *CNLAC1* en cepas salvajes (100) se observó que las cepas mutadas tenían menos virulencia que las cepas salvajes. Por lo tanto, parece ser que este factor de patogenicidad es tan importante y necesario como el conjunto de enzimas, cápsula y otros mas que, al menos, *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans* poseen para poder generar la enfermedad.

1.7 Métodos para evaluar *in vitro* la sensibilidad antifúngica

Se han descrito diversos métodos para conocer la sensibilidad *in vitro* de *Cryptococcus neoformans* a los antifúngicos utilizados en el tratamiento contra la criptococosis y para evaluar nuevos antifúngicos propuestos. Estos métodos son diferentes entre si y podemos encontrar técnicas cualitativas, semicuantitativas y cuantitativas.

El método clásico utilizado para evaluar la sensibilidad de los microorganismos, sobre todo bacterias, es la técnica cualitativa de *Kirby Bauer* (102) pero en el caso específico de los antifúngicos, a pesar de haberse estandarizado por el CLSI en el documento (103) éste método tiene la limitante de no considerarse adecuado para los antifúngicos no hidrosolubles como la anfotericina B.

Actualmente, se utiliza y es altamente recomendado evaluar la sensibilidad antifúngica mediante el método cuantitativo de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), siguiendo métodos estandarizados por instituciones acreditadas, como es el caso del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), antiguamente conocido como *National Committee for Clinical Standards* (NCCLS).

Existen varias guías editadas por el CLSI, en donde se dictan las pautas para realizar este método de microdilución en caldo, la mas recientemente publicada es la guía M27-A3 (104) que reemplaza a la guía anterior M27-A2 (105). En ésta nueva edición, se han modificado diversos puntos importantes, como por ejemplo la definición conceptual de una CMI, en donde ahora, es incluida una escala numérica para facilitar la interpretación de la acción del antimicrobiano. El nuevo concepto es el siguiente:

CMI: es la concentración mas baja de un agente antimicrobiano que provoca una reducción específica en el crecimiento visible de un microorganismo, tanto en agar como en pruebas de sensibilidad de dilución en caldo. La magnitud de la disminución del crecimiento visible es evaluada utilizando una escala numérica:

- 0 (cero): visualmente claro.
- 1: ligeramente turbio
- 2: disminución prominente del crecimiento visible (aprox. 50%).
- 3: ligera reducción del crecimiento visible
- 4: ninguna reducción en el crecimiento visible.

Se han realizado estudios para poder estandarizar esta técnica (106-108) y gracias a ellos se llegó a un consenso para la interpretación y validez de los valores de CMI obtenidas para *Candida*. Estos valores también son utilizados por la mayoría de los microbiólogos, para interpretar la sensibilidad de *Cryptococcus neoformans*. Los puntos de corte para clasificar las cepas de *Candida spp* y *Cryptococcus neoformans* en sensible (S), sensible dependiente de la dosis (SDD) o resistente (R) al fluconazol e itraconazol, son los siguientes (105) (Tabla 3):

Antifúngico	S (µg/mL)	SDD (µg/mL)	R (µg/mL)
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25-0,5	≥ 1

Tabla 3: Punto de corte de fluconazol e itraconazol para cepas de *Candida spp*. Tomado de manual NCCLS M27-A2 (105).

Actualmente no existen criterios aprobados para voriconazol o posaconazol para ninguna especie fúngica. Sin embargo, son muy utilizados los propuestos por Pfaller *et al* para el voriconazol (109):

Antifúngico	S (µg/mL)	SDD (µg/mL)	R (µg/mL)
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4

Tabla 4: Puntos de corte de voriconazol para cepas de *Candida spp*. Tomado de Pfaller *et al* JCM 2006 (109).

En el continente europeo, existen otros métodos estandarizados para determinar la sensibilidad de microorganismos a los antimicrobianos, como por ejemplo el documento *EDef 7.1*, que dicta las normas para realizar la técnica de determinación de sensibilidad de levaduras fermentadoras para agentes antifúngicos con dilución en caldo (110). Estas guías fueron aprobadas y editadas por la organización denominada *European Comité for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y la técnica es conocida popularmente como método EUCAST.

Existen métodos alternativos comerciales para obtener valores de CIM, tal es el caso del sistema Etest® comercializado por *AB Biodisk* (Solna). Esta técnica cuantitativa de

difusión en agar esta basada en tiras impregnadas con antifúngico, en un gradiente variable de concentración. Su correlación con el método del CLSI varía según los estudios realizados y depende de varios factores como son: los medios de cultivo empleados, tiempo de incubación y sobre todo la interpretación de la lectura del elipse de inhibición.

Hay muy pocos estudios que correlacionen los resultados obtenidos *in vitro* con la respuesta terapéutica *in vivo*. Es aceptado que una cepa sensible *in vitro* no es suficiente para predecir un éxito terapéutico, pero un valor alto de CIM a un determinado antifúngico puede predecir un fallo terapéutico (111,112).

La predicción del éxito terapéutico al iniciar el tratamiento en caso de una criptococosis ha sido estudiada por Larsen *et al* en 2005 (113), quienes investigaron la correlación de los resultados de sensibilidad *in vitro* con la respuesta *in vivo* en modelo murino al fluconazol, observando que era posible predecir el éxito terapéutico con los valores de las CMI, obtenidas por el método de macrodilución.

Los antifúngicos utilizados para el tratamiento de la criptococosis son anfotericina B (AB) desoxicolato o asociada a lípidos sola o en combinación con 5-fluorocitocina (5FC), pero también se puede utilizar el fluconazol *i/v* o por *v/o*, en enfermos inmunocompetentes, como terapia alternativa o complementaria o para profilaxis secundaria. También se ha propuesto al itraconazol (ITZ) como terapia de mantenimiento para evitar recidivas (114).

1.7.1 Anfotericina B

La anfotericina B (AB) es una molécula poliénica que se administra por vía endovenosa en solución con suero glucosado. Es ideal como tratamiento de elección ya que tiene actividad fungicida y a pesar de que no atraviesa bien la barrera hematoencefálica es muy eficaz para combatir esta micosis. Su administración produce numerosos efectos secundarios, producto de su alta nefrotoxicidad, ocasionando un aumento de los niveles de creatinina. También puede producir fiebre, escalofríos, *shock* e hipotensión (115).

Para reducir su toxicidad se ha incorporado la molécula de AB a cápsulas formadas por liposomas, también se han producido asociaciones con otras sustancias lipídicas. Para evaluar su eficacia, existen numerosos trabajos que han demostrado que se

puede elevar la dosis manteniendo una buena tolerancia (116,117). Sin embargo su uso es limitado en ciertos países donde la criptococosis es endémica, debido al elevado precio de los derivados lipídicos (AmBisome® Astellas Pharma US, Inc, Abelcet® Enzon Piscataway NJ).

1.7.2 5-Fluorocitosina

En 1964 se demostró que la 5-fluorocitosina (5FC) tenía actividad antifúngica, y que podía usarse de forma oral para el tratamiento de la criptococosis. Sin embargo la aparición de cepas resistentes de *Candida albicans* en el curso de monoterapia limitó su uso. En 1979, Bennett (118) demostró por primera vez el efecto sinérgico de la asociación de AB y 5FC en el tratamiento de la meningitis, incluyendo la ventaja de la disminución de la toxicidad renal, puesto que la asociación permite reducir la dosis de AB.

La 5FC es una molécula derivada de las pirimidinas fluoradas. Es hidrosoluble y tiene poca toxicidad aunque en algunos casos puede ocasionar efectos secundarios como leucopenia y trombocitopenia (119). Se puede administrar por vía oral o i/v y se ha demostrado que tiene una amplia difusión hacia el LCR.

Para ampliar las posibilidades de tratamiento de la criptococosis se van evaluando en diferentes modelos animales otras asociaciones terapéuticas como AB o 5FC junto a fluconazol (120), itraconazol con 5FC (121) y micafungina combinado con AB (122) entre otras, mostrando todas estas combinaciones buena actividad sinérgica.

1.7.3 Antifúngicos triazólicos

1.7.3.1 Fluconazol

La alteración de la membrana de la célula fúngica por inhibición de la síntesis del ergosterol es el mecanismo de acción de los azoles. En la vía enzimática del ergosterol por acción de los antifúngicos azólicos se bloquea la producción del lanosterol, ocasionando que se incremente su concentración (123). Al no producirse la demetilación del lanosterol, por acción de la enzima citocromo P450 14 α -demetilasa, los grupos intermediarios 14-metilados (14-metilergostal-8,24-(28)-dien-3,6-diol) son tóxicos y responsables de la inhibición del crecimiento fúngico.

Dado que en los mamíferos también ocurre el paso enzimático del lanosterol a colesterol, existe la posibilidad de que aparezcan efectos adversos en las células hepáticas. Mutaciones en el gen *ERG11* pueden conferir resistencia en las levaduras a los azoles (124,125).

El fluconazol (FNZ) es un agente químico hidrosoluble y se une muy escasamente a las proteínas plasmáticas. Su absorción oral es muy rápida y completa; después de una dosis 100 mg, la C_{max} es de 2 µg/ml, la cual se alcanza entre 2 y 4 horas. La vida media es de 24 horas y la farmacocinética es lineal con el incremento de la dosis. Una de las características del FNZ más destacada es la penetración en los líquidos biológicos de todo el organismo. En el LCR de los pacientes con meningitis, se alcanzan niveles similares a los plasmáticos, llegando a picos de 3-6 µg/ml, con dosis de 100 mg/día (126).

1.7.3.2 Itraconazol

El Itraconazol (ITZ) es una molécula lipófila e insoluble en agua. Se une fuertemente a las proteínas plasmáticas (99%) (127) y difunde pobremente al LCR, orina y otros líquidos biológicos, pero se acumula bien en tejidos adiposos como en el SNC. Se ha utilizado en ocasiones como tratamiento de la meningitis criptococosis en ciertos pacientes (128), aunque no es considerado como primera opción.

1.7.3.3 Voriconazol

El voriconazol (VNZ) no forma parte de la terapia antifúngica de elección del tratamiento de la criptococosis. A pesar de ello, se han realizado estudios para evaluar la eficacia de ésta droga en modelos murinos con meningitis criptocócica, demostrando que *in vitro* tiene excelente actividad antifúngica, con buenos niveles en el LCR y con evidencia de buena respuesta clínica (129).

1.7.3.4 Posaconazol

El antifúngico azólico más nuevo que se encuentra comercializado es el Posaconazol (POS). Su fórmula química es más parecida al Itraconazol que al FNZ (127). Se ha probado *in vitro* e *in vivo* la actividad antifúngica combinado con AB en modelos animales infectados con *Cryptococcus neoformans*; pero no presentó mayor actividad antifúngica que la AB sola (130).

1.8 Resistencia a los antifúngicos en *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans*

Los nuevos antifúngicos lipopéptidos derivados de las equinocandinas como caspofungina y anidulofungina no son activos sobre *Cryptococcus*, por el bajo contenido de B-glucanos de la pared celular (131), no obstante, en los tratamientos aplicados con antifúngicos activos en pacientes con criptococosis, no es común que se presente resistencia a los antifúngicos utilizados; pero cada vez más se observan cepas con resistencia marcada en especial a FLZ (132,133), las cuales han de ser confirmadas con pruebas estandarizadas que evalúen su sensibilidad y/o resistencia.

Algunos casos se han descrito al respecto, uno de ellos se refiere al uso de la 5FC sin combinar con AB. Speller *et al* en 1977 (134), describió un cuadro clínico de meningitis criptocócica tratada en un principio solamente con 5FC, a la que luego se le adicionó AB. Se observó fallo terapéutico y desarrollo de resistencia confirmada *in vitro*, por parte de la cepa de *Cryptococcus neoformans* aislada.

Recientemente Khyriem *et al* en 2006 (135), describieron una cepa aislada de un paciente de sureste de India de *Cryptococcus neoformans var gattii* resistente tanto a AB (CIM=32 µg/mL) como a FLZ (CIM=64 µg/mL).

Bicanic *et al*, en 2006 (136) describieron la existencia de cepas de *Cryptococcus neoformans* emergentes con sensibilidad disminuida o resistencia a FNZ (CMI>64 µg/mL) presentes en segundos episodios de criptococosis meníngea. Hasta ahora se han descrito pocos casos de resistencia a estos antifúngicos comúnmente utilizados. Pero, la sensibilidad parece variar dependiendo de la especie y la región geográfica origen de la cepa, por ejemplo, se ha descrito que los aislamientos procedentes de Africa son mas sensibles a fluconazol que los de Asia o Europa (137-139). Quindos *et al* (140), comentan que la resistencia *in vitro* a voriconazol de *Cryptococcus neoformans* obtenidos de aislados clínicos españoles es poco frecuente y que presenta tendencia a disminuir.

La criptococosis meníngea sin tratamiento suele tener un curso fatal pudiendo presentarse un elevado número de casos de mortalidad, por lo tanto la eficacia del tratamiento dependerá de la gravedad de los síntomas, del estado inmunitario del paciente y de la virulencia de la cepa.

Interés y justificación del estudio

2 Interés y Justificación del estudio

La patología producida por *C. gattii*, se asemeja en muchos casos a la producida por los patógenos primarios, por el hecho de ser capaz de afectar a personas y/o animales inmunocompetentes.

La criptococosis por esta especie hasta ahora ha sido considerada una micosis de mayor prevalencia en países tropicales o sub-tropicales. Se han descritos casos en prácticamente todo el mundo, siendo mas abundante en Australia seguida de América y Africa. Los casos clínicos descritos en países europeos donde la criptococosis no es endémica, por supuesto se consideran excepcionales.

En España se han reportado casos autóctonos de criptococosis tanto en humanos como en animales y se ha tratado de establecer alguna relación entre los pacientes y/o el ambiente que los rodeaba, con algún elemento “importado” (como árboles de Eucalipto o aves exóticas) perteneciente quizas a algún país tropical o subtropical. Ni en el caso descrito por Baro *et al*, acerca de los brotes de criptococosis ocurridos en rebaños caprinos en Extremadura (41) y diagnosticados en la Facultad de Veterinaria de Extremadura por Dr. M. Hermoso de Mendoza, ni en el caso señalado por Colom *et al* (42) del caso autóctono de un paciente masculino residente de Alicante, el cual desarrolló criptococoma cerebral por *C. gattii*, fue posible esclarecer como ocurrió la adquisición de la enfermedad.

Cuando el número de casos de criptococosis localizados en países de clima templado aumenta en un período corto de tiempo, es necesario considerar la alerta epidemiológica. El brote mas recientemente reportado fue el de La isla de Vancouver, British Columbia (BC) en Canadá, en 1999. Provocando que las autoridades sanitarias de la zona (*British Columbia Centre for Disease Control*) incluyeran a la criptococosis en la lista de enfermedades de notificación obligatoria.

Al ser considerado *Cryptococcus gattii* como una nueva especie separada filogenéticamente de *C. neoformans* y al actuar patológicamente como un patógeno primario infectando sujetos inmunocompetentes; sería posible demostrar diferencias en sus factores de patogenicidad y en los patrones de sensibilidad con respecto al *C. neoformans*.



Objetivos del estudio

3 Objetivos del estudio

Estudiar en *Cryptococcus gattii* serotipos B y C, y *C. neoformans* serotipos A y D; las características fenotípicas y genotípicas de dos de los factores de patogenicidad considerados mas importantes y analizar los patrones de sensibilidad a los antifúngicos, utilizados para el tratamiento de la criptococosis y a los antifúngicos de última generación.

Para realizar el objetivo principal del estudio, nos propusimos los siguientes:

1. Evaluar la actividad ureasa de *C. neoformans* y *C. gattii*, y establecer si existen diferencias en entre las dos especies.
2. Estudiar la actividad fenoloxidasa (lacasa) de cepas de *C. gattii* aislados de cabra con criptococosis comparándola con la actividad de esta enzima en cepas de *C. neoformans*.
3. Obtener un segmento del gen CNLAC1 específico de *Cryptococcus gattii*, serotipos B y C, que sea utilizado en la transcripción de la enzima lacasa.
4. Establecer patrones de sensibilidad de *C. neoformans* y *C. gattii* a los antifúngicos triazoles utilizados para el tratamiento de la criptococosis, así como para el nuevo azol comercializado, el Posaconazol.



Materiales y Métodos

4 Materiales y Métodos

4.1 Codificación de las cepas utilizadas

Todas las cepas de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* utilizadas en éste trabajo pertenecen o se encuentran almacenadas de la colección de la Unitat de Recerca en Malalties Infeccioses i Micologia (URMIM), del Institut Municipal de Investigació Mèdica (IMIM); ubicada en el edificio del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). Cada uno de los aislados estan almacenados en criotubos en una suspensión de agua destilada estéril a 4°C, en leche desnatada estéril y perlas a -20°C. Actualmente, las cepas también se encuentran en el laboratorio de Micología, Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández en Sant Joan d'Alacant, Alicante.

La codificación utilizada para la identificación de las cepas en este trabajo es la siguiente:

$$\mathbf{Xn^oy} = \text{A169a}$$

En donde

X: corresponde a la letra en mayúscula del serotipo A, B, C, D al cual pertenece el *Cryptococcus neoformans* o *C. gattii*.

nº: corresponde al número de entrada en el laboratorio URMIM, se asignó el número en que eran registradas al ser recibidas en la unidad.

y: corresponde a la letra en minúscula (a ó c) del origen ambiental ó clínico de la cepa en cuestión.

En este trabajo existen cepas con nomenclatura que no se corresponden a la codificación anterior, esto se ha realizado así, para respetar los números primarios de los autores originales de los aislados, así como, para mantener uniformidad con artículos publicados en los cuales se han utilizado estas cepas.

Dos cepas de *C. gattii* serotipo C, TIMM1315 e IFM5875, fueron generosamente cedidas por el Dr. Valerio Vidotto del Laboratorio de Micología Medica, Dipartimento Discipline Medico-Chirurgiche, Sezione Microbiologia Clinica, Università di Torino y por el Dr. Shigeji Aoki de la Nippon Dental University at Niigata, Departamento Advanced Research Center.

4.2 Cepas utilizadas en cada objetivo del estudio

4.2.1 Objetivo 1

Evaluar la actividad ureasa de *C. neoformans* y *C. gattii*, y establecer si existen diferencias en entre las dos especies.

CEPAS	SEROTIPO	ESPECIE	ORIGEN	País
A169a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	Brasil
A178c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A33c	A	<i>C. neoformans</i>	Sangre	España
A25c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A95a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
A84c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A2a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
A74c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A1a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
A146a	A	<i>C. neoformans</i>	Árbol	España
A41c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A76a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
A186c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A158c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A43c	A	<i>C. neoformans</i>	Orina	España
D6c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D179c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D1c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D99c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D12c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D297c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D94c	D	<i>C. neoformans</i>	Médula ósea	España
D145c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D181c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D97c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
GR-56	B	<i>C. gattii</i>	Intestino cabra	España
GR-46	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B269c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	México
B104c	B	<i>C. gattii</i>	Cheeta	Cuba
B432c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	México
B75a	B	<i>C. gattii</i>	Heces paloma	Brasil
BV19*	C	<i>C. gattii</i>	LCR	Venezuela
GR-52	B	<i>C. gattii</i>	Cerebro cabra	España
GR-53	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
H0058**	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Colombia
C24a	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Brasil
B267c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	México
B74a	B	<i>C. gattii</i>	Árbol	Brasil
GR-50	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
GR-48	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
GR-59	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B162a	B	<i>C. gattii</i>	Árbol	Perú
B268c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	México
4506***	B	<i>C. gattii</i>	Árbol	Australia

Tabla 5: Cepas utilizadas para la determinación de la actividad ureasa (n=44).

*En el artículo nº1, estas cepas corresponden a *417C, **160A y ***161A.

4.2.2 Objetivo 2

Estudiar la actividad fenoloxidasa (lacasa) de cepas de *C. gattii* aislados de cabra con criptococosis comparándola con la actividad de *C. neoformans*.

CEPAS	SEROTIPO	ESPECIE	ORIGEN	País
A146c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A74c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D297c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D12c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
B432c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Méjico
4506	B	<i>C. gattii</i>	Ambiental	Australia
GR-52	B	<i>C. gattii</i>	Cerebro cabra	España
GR-59	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
GR-48	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
GR-50	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
GR-53	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
GR-56	B	<i>C. gattii</i>	Intestino Cabra	España
H0058	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Colombia
BV19	C	<i>C. gattii</i>	LCR	Venezuela

Tabla 6: Cepas utilizadas en la determinación de la actividad fenoloxidasa (n=14).

4.2.3 Objetivo 3

Obtener un segmento del gen CNLAC1 específico de *Cryptococcus gattii*, serotipos B y C, que sea utilizado en la trascrición de la enzima lacasa.

CEPAS	SEROTIPO	ESPECIE	ORIGEN	País
A17c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A19c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A74c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A146c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A148c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A469c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A473c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Cuba
A101c	A	<i>C. neoformans</i>	BAL	Cuba
A102c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A122a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
A129a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	Chile
A145a	A	<i>C. neoformans</i>	Árbol	Chile
A177a	A	<i>C. neoformans</i>	Árbol	Turquía
A178a	A	<i>C. neoformans</i>	Árbol	Turquía
B48c	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B50c	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B52c	B	<i>C. gattii</i>	LCR cabra	España
B53c	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B56c	B	<i>C. gattii</i>	Intestino cabra	España
B58c	B	<i>C. gattii</i>	LCR cabra	España

B59c	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B60c	B	<i>C. gattii</i>	LCR cabra	España
B432c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Méjico
B470c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	España
B163c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B170c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B171c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B172c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B173c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B174c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B331c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Colombia
B46a	B	<i>C. gattii</i>	avispero	Uruguay
B73a	B	<i>C. gattii</i>	Heces murciélago	Brasil
B74a	B	<i>C. gattii</i>	Árbol	Brasil
B162a	B	<i>C. gattii</i>	Árbol	Perú
4506	B	<i>C. gattii</i>	ambiental	Australia
C24a	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Brasil
BV19	C	<i>C. gattii</i>	LCR	Venezuela
H0058	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Colombia
TIMM 1315	C	<i>C. gattii</i>	desconocido	Japón
D21c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D35c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D38c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D145c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D179c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D181c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D182c	D	<i>C. neoformans</i>	Sangre	España
D183c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D297c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D9a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
D11a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
D12c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D16a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
D18a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
D71a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España

Tabla 7: Cepas utilizadas en el estudio del gen CNLAC1 (n=55).

4.2.4 Objetivo 4

Establecer patrones de sensibilidad de *C. neoformans* y *C. gattii* a los antifúngicos utilizados para el tratamiento de la criptococosis, así como para el nuevo azol comercializado, el Posaconazol.

CEPAS	SEROTIPO	ESPECIE	ORIGEN	País
A95a	A	<i>C. neoformans</i>	Paloma	España
A97a	A	<i>C. neoformans</i>	Paloma	España
A118a	A	<i>C. neoformans</i>	Paloma	España
A119a	A	<i>C. neoformans</i>	Paloma	España
A148a	A	<i>C. neoformans</i>	Paloma	España
A17c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A19c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A148c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A469c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A473c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Cuba

A101c	A	<i>C. neoformans</i>	BAL	Cuba
A102c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Cuba
A108c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Cuba
A109c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Cuba
A112c	A	<i>C. neoformans</i>	Sangre	Uruguay
A302c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Uruguay
A304c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Uruguay
A306c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Uruguay
A307c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Uruguay
A312c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Colombia
A332c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Colombia
A333c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Colombia
A334c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Colombia
A335c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Colombia
A339c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Colombia
B169c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B48a	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B50a	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B52a	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B53a	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B56a	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B58a	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B59a	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B60a	B	<i>C. gattii</i>	Cabra	España
B470c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	España
B163c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B170c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B171c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B172c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B173c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B174c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B331c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Colombia
B168c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B175c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B257c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Méjico
B258c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Méjico
B416c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Venezuela
B260c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Méjico
B259c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Méjico
B261c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Méjico
BV19	C	<i>C. gattii</i>	LCR	Venezuela
H0058	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Colombia
C 24a	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Brasil
TIMM1315	C	<i>C. gattii</i>	desconocido	Japón
IFM5875	C	<i>C. gattii</i>	desconocido	Japón
D1c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D2c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D3c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D6c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D13c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D32c	D	<i>C. neoformans</i>	Sangre	España
D94c	D	<i>C. neoformans</i>	Medula ósea	España
D97c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D125c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	Argentina
D213c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	Argentina
D399c	D	<i>C. neoformans</i>	Sangre	España
D21c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D35c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España

D38c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D188c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D145c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D192c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D183c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D191c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D311c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	Uruguay
D182c	D	<i>C. neoformans</i>	Sangre	España
D187c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D309c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	Uruguay
D181c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D179c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España

Tabla 8: Cepas utilizadas en las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos (n=80).

4.3 Cepas de control de calidad

Las cepas de *Candida parapsilopsis* ATCC® 22019 y *Candida krusei* ATCC® 6258 provenientes de la colección ATCC® marca registrada de *American Type Culture Collection*, fueron utilizadas para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos en los ensayos desarrollados en esta tesis y cuyos valores límites de concentración mínima inhibitoria se muestran en la Tabla 9.

Organismo	Antifúngico	Rango (µg/mL)
<i>Candida parapsilopsis</i> ATCC® 22019	Fluconazol	0,5-4,0
	Voriconazol	0,016-0,12
	Posaconazol	0,06-0,25
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Fluconazol	8,0-64
	Voriconazol	0,06-0,5
	Posaconazol	0,06-0,5

Tabla 9: Límites recomendados para CMI (µg/mL) en 24 horas para las cepas ATCC® utilizadas para Microdilución en Caldo. Tomado de Manual M27-A2 (105).

En los artículos obtenidos durante el desarrollo de cada objetivo planteado en esta tesis, se comenta la metodología empleada para desarrollar cada uno de ellos.

Resultados y Discusión

Objetivo 1

Artículo 1: Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 51-55

Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*

Josep M. Torres-Rodríguez¹, Eidi Alvarado-Ramírez¹ y Ricardo Gutiérrez-Gallego²

¹Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Micología, Institut Municipal d' Investigació Mèdica, Unidad Docente del Instituto Municipal de Asistencia Sanitaria, Universitat Autònoma de Barcelona;

²Departamento de Investigación de Ciencias de la Salud, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España

Resumen

Se considera que la capacidad de *Cryptococcus neoformans* para sintetizar ureasa es uno de sus principales factores de virulencia. Desde 2002 se acepta que la variedad *gattii* de *C. neoformans* reúne los atributos necesarios para considerarse como una nueva especie, *Cryptococcus gattii*. No existen estudios experimentales controlados que comparen el grado de actividad ureasa de ambas especies. El objetivo de este trabajo ha sido analizar la producción de esta enzima en aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii*, considerando la distribución en serotipos de los aislamientos y su origen (clínico o ambiental), utilizando un nuevo método semicuantitativo estandarizado. Veinticinco aislamientos de *C. neoformans* y 19 de *C. gattii* fueron sembrados en medio líquido de urea de Christensen para determinar la producción de ureasa por espectrofotometría. Como referencia se determinó la actividad de una unidad de ureasa (*jack beans urease*®, Sigma) sobre el mismo medio de cultivo y se observó que el 50 % de la actividad enzimática correspondía a una densidad óptica de $A_{550} = 0,215$. Esta absorbancia permitió clasificar la actividad ureasa para cada aislamiento de *Cryptococcus*. Los resultados mostraron que bajo las mismas condiciones, estas levaduras podían agruparse en dos categorías, bajas productoras de ureasa ($A_{550} < 0,215$) y altas productoras ($A_{550} \geq 0,215$). A las 72 horas de incubación, el 76 % de los aislamientos de *C. neoformans* y el 15,8 % de los de *C. gattii* resultaron altos productores de ureasa. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre ambas especies ($p = 0,016$). Los resultados obtenidos muestran que *C. neoformans* es mayor productor de ureasa que *C. gattii*.

Palabras clave

Cryptococcus neoformans, *Cryptococcus gattii*, Factores de patogenicidad, Ureasa

Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*

Summary

Urease is an enzyme considered one of the main virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. Quantitative differences in urease production between *C. neoformans* and the new species *Cryptococcus gattii* have not been so far documented. Using a standardized method, 25 isolates of *C. neoformans* and 19 of *C. gattii* were seeded in Christensen urea broth medium for urease activity detection. Approximately, the 50 % of activity of one unit of commercial *jack beans urease* ($A_{550} = 0.215$) was considered as a reference to classified the *Cryptococcus* in two categories, low ($A_{550} < 0.215$) or high ($A_{550} \geq 0.215$) urease producers. After 72 hours of incubation, 76 % of *C. neoformans* and 15.8 % of *C. gattii* strains were high urease producers ($p = 0.016$). Based on these results, the species *C. neoformans* appeared as the highest urease producer. Other virulence factors should also be investigated to explain *C. gattii* pathogenicity.

Key words

Cryptococcus neoformans, *Cryptococcus gattii*, Pathogenic factors, Urease

Dirección para correspondencia:
Dr. Josep M. Torres-Rodríguez
IMIM
C/Dr. Aiguader 88
08003 Barcelona, España
Tel.: +34 933160400
Fax: +34 933160410
E-mail: jmtorres@imim.es

Aceptado para publicación el 19 de octubre de 2007

©2008 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

La ureasa es una metaloenzima que cataliza la conversión de urea a amonio y carbamato. La detección de esta enzima se utiliza corrientemente como una prueba para la identificación de diversos microorganismos, entre ellos *Cryptococcus* [1,19].

La ureasa es considerada junto con otras enzimas (proteinasas, fosfolipasas y lacasas) como un importante factor de virulencia [9,12,27]. Excepcionalmente se han aislado cepas de *Cryptococcus neoformans* sin actividad ureasa de pacientes con criptococosis [4].

Las dos antiguas variedades de *C. neoformans* se han reclasificado en dos especies diferentes: *C. neoformans* (serotipos A y D) y *Cryptococcus gattii* (serotipos B y C) [17]. Prácticamente todos los estudios realizados en relación a la actividad ureasa se han efectuado en *C. neoformans* o no se ha especificado la variedad utilizada.

La mayoría de los pacientes de criptococosis están infectados por *C. neoformans* variedad *grubii* (serotipo A), que se aísla con mayor frecuencia de muestras ambientales relacionadas, principalmente, con excrementos de palo-

mas [13,15,20]. *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) también se ha aislado de muestras clínicas y ambientales en determinadas áreas geográficas [3].

La nueva especie *C. gattii* presenta una distribución geográfica más restringida, obteniéndose del medio ambiente, estando relacionada con material vegetal, si bien es también agente etiológico de criptococosis humana y animal, produciendo en ocasiones verdaderas epidemias [2,14]. A pesar de que la mayor presencia de esta especie se ha descrito en Australia, Nueva Zelanda y el continente americano [23] también se ha encontrado en Europa incluyendo España [10,13], donde fue la causa de brotes epidémicos en cabras inmunocompetentes en la provincia de Cáceres [26].

La patología producida por *C. gattii* puede ser similar a la ocasionada por hongos patógenos primarios, afectando a sujetos no inmunodeprimidos [24]. Por dicho motivo es importante estudiar específicamente los factores de patogenicidad de *C. gattii*, comparándolos con los que han sido descritos para *C. neoformans* [5].

Tabla 1. Distribución de las cepas evaluadas: especies, serotipos, origen humano, animal o ambiental. Lectura espectrofotométrica (550 nm) de 25 aislamientos de *C. neoformans* y 19 de *C. gattii* cultivados en medio líquido de urea de Christensen a las 72 h de incubación.

Cepa	Especie	Serotipo	Origen	País (550 nm)	Absorbancia
169 A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	Brasil	0,121
178C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,146
33C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,149
25C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,235
95A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	España	0,275
84C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,282
2A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	España	0,320
74C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,301
1A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	España	0,324
146A	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,331
41C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,338
76A	<i>C. neoformans</i>	A	ambiental	España	0,414
186C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,432
158C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,475
43C	<i>C. neoformans</i>	A	clínica humana	España	0,501
6C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,153
179C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,160
1C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,190
99C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,275
D12C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,288
D297C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,295
94C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,322
145C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,374
181C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,458
97C	<i>C. neoformans</i>	D	clínica humana	España	0,474
GR-56	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,132
GR-46	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,139
269C	<i>C. gattii</i>	B	clínica humana	México	0,145
104C	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (<i>cheeta</i>)	Cuba	0,145
432C	<i>C. gattii</i>	B	clínica humana	México	0,149
75A	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Brasil	0,150
417C	<i>C. gattii</i>	C	clínica humana	Venezuela	0,163
GR-52	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,175
GR-53	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,175
160A	<i>C. gattii</i>	C	ambiental	Colombia	0,176
24C	<i>C. gattii</i>	C	ambiental	Brasil	0,177
267C	<i>C. gattii</i>	B	clínica humana	México	0,178
74A	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Brasil	0,183
GR-50	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,184
GR-48	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,191
GR-59	<i>C. gattii</i>	B	veterinario (cabra)	España	0,208
162A	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Perú	0,259
268C	<i>C. gattii</i>	B	clínica humana	México	0,315
161A	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Australia	0,331

En 1987, Kwon-Chung et al. [16], estudiando solo tres cepas de las dos variedades de *C. neoformans*, describieron que el EDTA, debido a su efecto quelante, suprimía la actividad ureasa de la variedad *gattii*, pero no de la variedad *neoformans*. Hasta la fecha no existen publicaciones que, utilizando un método estandarizado, describan las posibles diferencias cuantitativas en la actividad ureasa entre *C. neoformans* and *C. gattii*.

El objetivo de este trabajo fue clasificar los niveles de actividad ureasa de un número importante de aislamientos de todos los serotipos de *C. neoformans* y *C. gattii*. Para ello se ha diseñado un método estandarizado que permite analizar objetivamente las diferencias en la actividad enzimática en las cepas estudiadas.

La información obtenida contribuye a conocer las diferencias en este factor de patogenicidad existente en las dos especies de *Cryptococcus*.

Materiales y métodos

Aislamientos. Se han incluido 44 cepas de ambas especies, siendo 25 de *C. neoformans*, de las cuales 15 pertenecen al serotipo A (variedad *grubii*), y 10 al serotipo D (variedad *neoformans*). De las 19 cepas correspondientes a *C. gattii*, 16 son del serotipo B y tres del serotipo C.

Cinco aislamientos del serotipo A, cuatro del B y dos del C se obtuvieron de muestras ambientales. Las demás cepas de *C. neoformans* se aislaron del líquido cefalorraquídeo de pacientes infectados con el VIH que habían desarrollado una meningitis criptocócica. Ocho cepas de *C. gattii* fueron aisladas de animales inicialmente sanos y cinco de pacientes con criptococosis del sistema nervioso central (Tabla 1).

Todos los aislamientos se conservaron a -20°C en leche descremada en la colección del URMIM (*Unitat de Recerca en Malalties Infeccioses i Micologia*/Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Micología). En el momento de utilizarse se sembraron en agar glucosado de Sabouraud para confirmar que las levaduras eran viables y el cultivo puro, verificándose el serotipo por medio de la prueba de aglutinación de látex (*Crypto-Check kit*, Iatron Labs Inc, Japón).

Medio de cultivo. Se utilizó el medio líquido de urea de Christensen (Difco, Detroit, EE.UU.) [1]. Este caldo contiene urea (20 g/l, 300 nM) y rojo-fenol como indicador de pH. La conversión de urea a amonio incrementa el pH y se produce un cambio de color de amarillo a rosa brillante; en este caso la reacción se considera positiva. Las variaciones en la intensidad de la reacción pueden ser detectadas por espectrofotometría.

Determinación de la actividad enzimática. Para elaborar la recta de la actividad enzimática, se empleó una unidad de ureasa comercial (*Jack beans urease*®, Sigma Aldrich, España), que fue diluida en tampón fosfato potásico ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) 10 mM, pH 8.

Diez microlitros de la solución de la enzima fueron agregados a tubos de vidrio que contenían 3 ml de caldo de urea de Christensen. La mezcla se incubó a 37°C midiéndose la absorbancia a 550 nm a partir de cada minuto durante un periodo de 20 minutos, momento a partir del cual no se apreciaron más variaciones. La recta de regresión se elaboró utilizando los valores numéricos de absorbancia de las diferentes lecturas (Figura 1). Esta recta se consideró como el patrón de referencia para tomar un punto de corte que permitiera categorizar el grado de actividad ureasa correspondiente a cada aislamiento de *Cryptococcus* sembrado en el mismo medio.

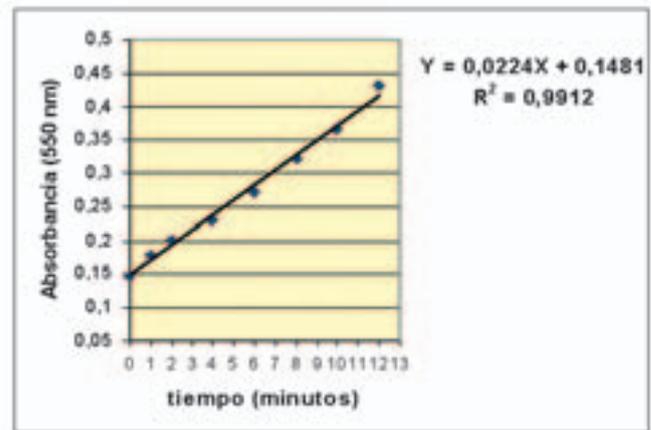


Figura 1. Recta de referencia realizada a partir de una unidad de ureasa comercial (*jack bean's urease*®, Sigma) actuando entre 0 y 15 minutos sobre el medio líquido de urea de Christensen. Máxima absorbancia obtenida ($A = 0,432$) a los 12 min. Punto de corte correspondiente al 50 % de actividad enzimática $A = 0,215$.

Cultivo e incubación de los aislamientos. Cada uno de los 44 aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii* fue suspendido en una solución salina tamponada con fosfato, pH 7, ajustando la concentración a 10^5 CFU/ml por recuento en cámara de Neubauer. Un volumen de 0,1 ml de cada suspensión fue inoculado en 12 tubos que contenían cada uno 3 ml de medio líquido de urea de Christensen. Todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 144 horas. A partir de la primera hora de incubación y en las 2, 4, 24, 72, 96, 120 y 144 horas, se utilizó uno de los tubos para leer la absorbancia de su contenido. La actividad enzimática se midió utilizando un espectrofotómetro (Hewlett Packard 8452A) a 550 nm.

Estos procedimientos se realizaron por duplicado en un 25 % de los aislamientos, tomados al azar.

Control de crecimiento. Una muestra de cada inóculo se cultivó a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas en placas de agar glucosado de Sabouraud, incubando a 37°C durante 48 horas. Se contaron el número de UFC/ml desarrolladas con cada cepa en los periodos indicados.

Análisis estadístico. Los resultados se presentan en valores absolutos y en porcentajes. La prueba de Pearson χ^2 fue aplicada para estudios comparativos y la *t* de Student se aplicó para analizar la distribución de las variables. La significación estadística se situó en $p < 0,05$.

Se utilizó el programa estadístico SPSS-Windows 14.0 (SPSS Inc. EE.UU.) para realizar todas las pruebas.

Resultados

La unidad de ureasa comercial actuó rápidamente sobre el medio líquido de Christensen, comprobándose que la cinética enzimática produce el máximo de cambio calorimétrico en 12 min, tiempo en que se ha producido la transformación de urea a amonio. En este momento, la absorbancia a 550 nm alcanzó un valor de 0,450, que persistió sin cambios hasta los 20 min. La figura 1 muestra la actividad enzimática en función del tiempo de una unidad de urea en valores de absorbancia a 550 nm. El mismo método se aplicó en tres ocasiones en diferentes días, obteniéndose resultados similares,

Para poder clasificar la actividad ureasa durante el periodo de incubación de las cepas de *Cryptococcus* se consideró un valor arbitrario del 50 % de la absorbancia máxima que correspondía a 0,215. Este valor es el que se alcanza con una unidad enzimática de ureasa a los tres minutos de incubación (Figura 1).

Conforme a este punto de corte, las cepas que produjeron $A_{550} < 0,215$ fueron categorizadas como bajas productoras de ureasa, mientras que por encima de $A_{550} \geq 0,215$ se clasificaron como altas productoras de esta enzima.

A las 72 h de incubación la mayoría de los aislamientos de *Cryptococcus* habían incrementado los valores iniciales de absorbancia, incremento que fue progresivo hasta las 144 h en que se estabilizó. La distribución de los valores de absorbancia de las cepas por especies, serotipos y origen clínico (humano, veterinario o ambiental) se muestran en la tabla 1.

Los primeros cambios con significación estadística se observaron a las 72 h, por lo que se tomó este tiempo de incubación para efectuar el análisis comparativo de los distintos valores de absorbancia obtenidos.

Al cabo de 144 h de incubación se comprobó un considerable aumento en el pH del medio, resultando superior a ocho en el 64 % de los tubos. Al efectuar el cultivo de todos los aislamientos se comprobó que el 25 % de las cepas no eran viables.

Las variaciones observadas en la absorbancia de las 44 cepas de *Cryptococcus* a las 72 h de incubación, teniendo en cuenta el punto de corte $A_{550} < 0,215$, se muestran en la figura 2. Cuatro de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* alcanzaron el valor máximo de absorbancia: 0,450-0,500.

En 11 cepas tomadas aleatoriamente, correspondientes al 25 %, del total se repitieron las determinaciones en dos ocasiones, obteniéndose resultados semejantes, con una variación máxima de 0,07.

El 76 % de los aislamientos de *C. neoformans* (n = 19) y el 15,8 % de los de *C. gattii* (n = 3) fueron clasificados como altos productores de ureasa, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p = 0,016). Por el contrario, no hubo diferencias significativas según el origen clínico o ambiental de las cepas ni entre los serotipos A y D.

Discusión

La ureasa es una metaloenzima considerada como un importante factor de patogenicidad en muchos microorganismos, como *Proteus mirabilis* y *Helicobacter*, entre otros [18,19].

La capacidad de sintetizar ureasa por *Cryptococcus* ha sido utilizada como una prueba bioquímica de identificación desde hace más de medio siglo [22] y también es considerada como uno de los principales factores de virulencia en *Cryptococcus neoformans* [11]. Olszewski et al. han sugerido en un modelo experimental de criptococosis del ratón, que la ureasa producida durante la diseminación hematogena por la cepa *C. neoformans* H99, contribuye a la invasión del sistema nervioso central al incrementar la presencia de levaduras del lecho de los capilares del cerebro [21].

La actividad ureasa en aislamientos de *Cryptococcus* se puede demostrar por diversas pruebas de laboratorio, incluyendo métodos rápidos [7]; no obstante la prueba de la ureasa en medio de Christensen es la más ampliamente utilizada [28].

Solamente se dispone de información muy limitada referida a la actividad ureasa por las diferentes especies de *Cryptococcus*. Booth y Vishniac describieron en 1987 que *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (*C. neoformans*) presentaba una resistencia diez veces superior a la de *F. neoformans* var. *bacillispora* (*C. gattii*) al EDTA (ácido etilendiamina-tetraacético), agente quelante que inhibe la producción de ureasa [6]. Kwon-Chung et al.,

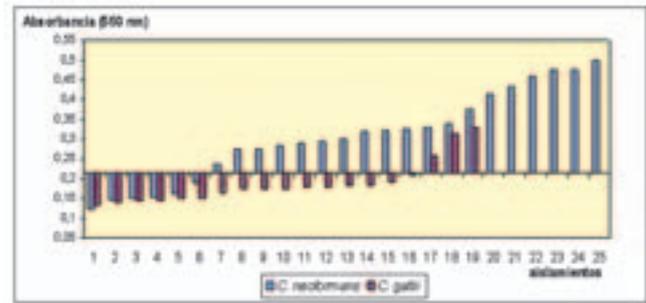


Figura 2. Lectura espectrofotométrica a 550 nm de la actividad ureasa de *Cryptococcus neoformans* (n = 25) y *Cryptococcus gattii* (n = 19) después de 72 h de incubación en medio líquido de urea de Christensen.

Punto de corte A = 0,215: 76 % de los aislamientos de *C. neoformans* y el 15,8 % de los de *C. gattii* (n = 3) fueron clasificados como altos productores de ureasa.

analizaron extractos celulares de la cepa NIH 191 de *C. neoformans* var. *gattii*, observando que 100 μ M de EDTA producía una reducción del 86 % en la actividad ureasa, y que ésta era solamente del 30 % en la cepa B-3501 de *C. neoformans* var. *neoformans* [16]. Estos investigadores sugirieron que se podría utilizar una prueba de inhibición de la ureasa como otro criterio más para distinguir las dos variedades –actualmente especies– de *Cryptococcus*.

Los resultados obtenidos con el control de crecimiento, no mostraron diferencias en la velocidad de desarrollo de las diferentes cepas que pudieran indicar que la mayor producción de ureasa fuera dependiente de una mayor biomasa.

Los datos de este estudio han permitido clasificar en dos categorías el grado de actividad en un considerable número de aislamientos diversos de ambas especies. Estadísticamente se ha demostrado que *C. neoformans* posee mayor actividad ureasa que *C. gattii*, sin que se hallaran diferencias significativas entre los serotipos A y D.

Varias de las cepas de *C. gattii* del serotipo B estudiadas habían demostrado ser altamente patógenas en un modelo experimental de criptococosis en ratones inmunocompetentes [25]. Estas mismas cepas presentaron un bajo nivel de actividad ureasa, por lo que cabe suponer que la actividad de otras enzimas como la lacasa [12] y la fosfolipasa [27], así como diversos factores patógenos juegan un rol fundamental en la virulencia de esta especie [5,8].

Aunque indudablemente la ureasa tiene un rol importante en la patogenicidad de ambas especies de *Cryptococcus*, es muy probable que sea el efecto de varios factores combinados lo que determina la virulencia de esta levadura.

Este estudio recibió el soporte PI02/0413 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), del Ministerio de Sanidad de España.

Agradecemos a Joan Vila y Josep M. Manresa el asesoramiento estadístico y a Yolanda Morera su ayuda técnica.

Bibliografía

1. Atlas RM, Parks LC. Handbook of Microbiological Media. Boca Raton, CRC Press, 1993.
2. Baró T, Torres-Rodríguez JM, De Mendoza MH, Morera Y, Alía C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 458-461.
3. Baró T, Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Alía C, Lopez O, Mendez R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1170-1172.
4. Bava AJ, Negroni R, Bianchi M. Cryptococcosis produced by urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 87-89.
5. Blackstock R, Buchanan KL, Cherniak R, Mitchell TG, Wong B, Bartiss A, Jackson L, Murphy JW. Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* is associated with quantitative differences in multiple virulence factors. *Mycopathologia* 1999; 147: 1-11.
6. Booth JL, Vishniac HS. Urease testing and yeast taxonomy. *Can J Microbiol* 1987; 33: 396-404.
7. Canteros CE, Rodero L, Rivas MC, Davel G. A rapid urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1996; 136: 21-23.
8. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC, ASM Press 1998.
9. Chen LC, Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 5: 570-574.
10. Colom MF, Frases S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, Sánchez M, Torres-Rodríguez JM. First local case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3548-3550.
11. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun* 2000; 68: 443-448.
12. Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol* 1999; 37: 175-181.
13. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 82-90.
14. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17258-17263.
15. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 123-130.
16. Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennett JE. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1987; 55: 1751-1754.
17. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurians* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 2002; 51: 804-806.
18. Mathur S, Suller MT, Stickler DJ, Feneley RC. Factors affecting crystal precipitation from urine in individuals with long-term urinary catheters colonized with urease-positive bacterial species. *Urol Res* 2006; 34: 173-177.
19. Mc Gee DJ, Coker C, Testerman TL, Harro JM, Gibson SV, Mobley HL. The *Helicobacter pylori* f1bA flagellar biosynthesis and regulatory gene is required for motility and virulence and modulates urease of *H. pylori* and *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol* 2002; 51: 958-970.
20. Morera-López Y, Torres-Rodríguez JM, Jiménez-Cabello T, Baró-Tomás T, Alía-Aponte C, Lázera MS. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. *Mycopathologia* 2005; 160: 9-14.
21. Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol* 2004; 164: 1761-1771.
22. Seeliger HP. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *J Bacteriol* 1956; 72: 127-131.
23. Sorrell T. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 2001; 39: 155-168.
24. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Disc* 1995; 21: 28-36.
25. Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Baró T, Corominas JM, Castañeda E. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. *Med Mycol* 2002; 41: 59-63.
26. Torres-Rodríguez JM, Hermoso de Mendoza M, Alvarado-Ramírez E, Segura-Roca G. Cryptococcosis by *Cryptococcus gattii* in immunocompetent goats in Spain and review of the literature. *Acta Sci Vet* 2006; 34: 245-253.
27. Vidotto V, Leone R, Sinicco A, Ito-kuwa S, Criseo G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Mycopathologia* 1998; 142: 71-76.
28. Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. Sexta edición. Washington, ASM, 1995: 723-737.

5 Resultados y Discusión

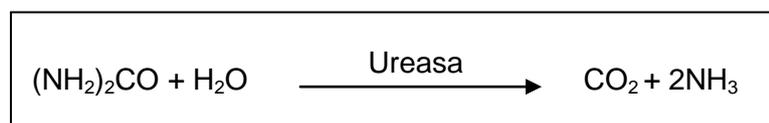
5.1 Objetivo 1

Evaluar la actividad ureasa de *C. neoformans* y *C. gattii*, y establecer si existen diferencias entre ellas.

5.1.1 Artículo 1: Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 51-55

Debido a que la actividad ureasa es considerada un factor mayor de patogenicidad en *Cryptococcus*, nos planteamos el objetivo de analizar la producción de la enzima ureasa en un número considerable de aislamientos de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, en cada una de las cepas, tomando en cuenta la distribución en serotipos y su origen clínico o ambiental.

El método escogido para tal fin, debía permitir realizar una clasificación, al menos semicuantitativa, de la producción de ureasa. La forma clásica de evidenciar esta actividad enzimática en los laboratorios de rutina, se realiza mediante la prueba microbiológica de urea en medio sólido de Christensen, en donde se emplea un agar, con tripteína y glucosa, los cuales son el aporte nutritivo suficiente para que crezcan la mayoría de los microorganismos. Si el hongo sembrado produce ureasa, hay un cambio de color amarillo a rosado intenso debido a la alcalinización del medio, detectado por el rojo de fenol, esto es producido al hidrolizarse la urea, en presencia de agua y liberarse amonio y dióxido de carbono.



Esta técnica clásica aporta resultados exclusivamente cualitativos, y para poder clasificar esta actividad enzimática en alta producción o baja producción, decidimos utilizar un método original que hasta ahora no había sido aplicado en *Cryptococcus*. Para ello se diseñó el medio líquido de urea de Christensen que ofrece la posibilidad de evaluar cambios en la actividad ureasa ya que la intensidad de la reacción

colorimétrica generada puede ser registrada por un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 550nm.

Para poder clasificar la producción de ureasa era necesario disponer de un punto de referencia y para ello, se realizó una recta patrón con una unidad de ureasa comercial (*Jack beans urease*®, Sigma Aldrich, España). En base a ello, se consideró como punto de corte cercano a 50% de la actividad máxima que presentó la enzima pura. De esta forma las cepas fueron clasificadas en altas productoras, si lograban alcanzar o sobrepasar éste valor, y en bajas productoras de ureasa si obtenían valores inferiores.

En la Figura 10, que se presenta en el artículo nº1, se observa que el 76% de los aislamientos de *C. neoformans* (n=19) produjo valores considerados en nuestro trabajo como altos productores de ureasa. Por el contrario, solo el 19% de las cepas de *C. gattii* (n=3) alcanzaron esta clasificación. El análisis estadístico demostró que no hubo diferencias significativas según el origen clínico o ambiental, y tampoco hubo diferencias entre los serotipos de ambas especies.

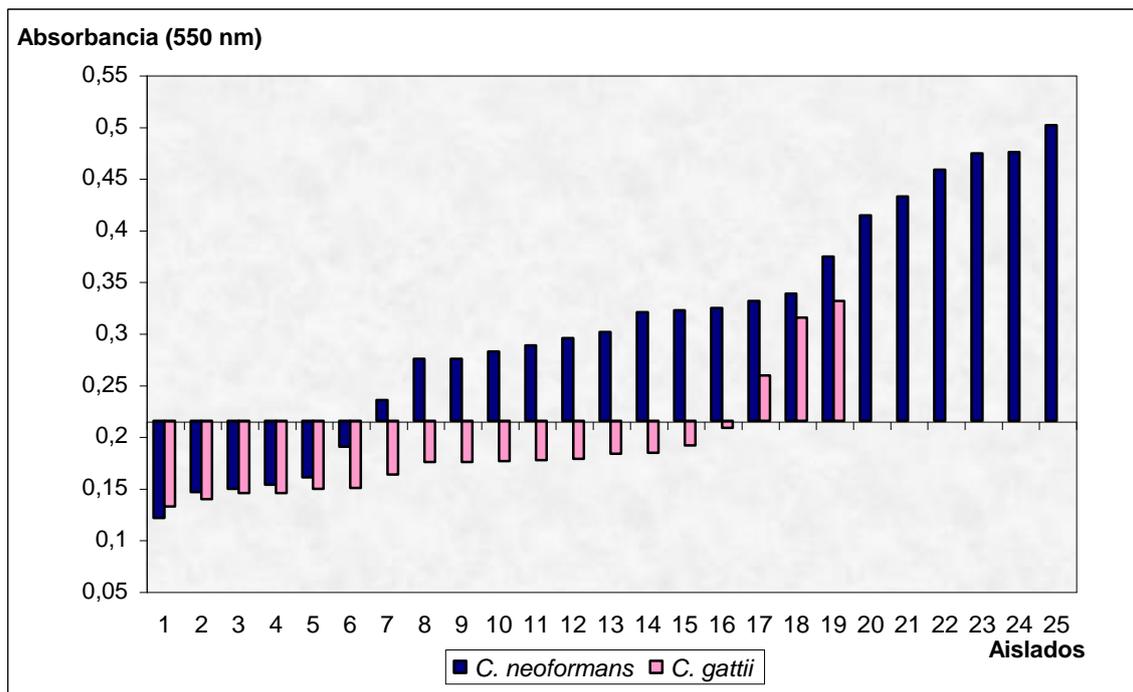


Figura 10: Lectura espectrofotométrica de la actividad ureasa de *Cryptococcus neoformans* (n=25) y *Cryptococcus gattii* (n=19). Punto de corte A=0,215: 76% de los aislamientos de *C. neoformans* y 15,8% de *C. gattii*, fueron clasificados como altos productores de urea.

Cabe destacar que junto con las cepas estudiadas, se realizó un control de crecimiento, comprobando que el número de UFC/mL presente en los tubos de las reacciones, al finalizar las 72 h que duró el ensayo, era aproximadamente 1×10^5 UFC/mL, es decir, el mismo número de células con el cual se inició la reacción. Por lo tanto, las cepas no mostraron diferencias en la velocidad de desarrollo que pudieran influir en una mayor producción de ureasa, dependiente de la biomasa.

La enzima ureasa ha sido estudiada a lo largo de los años, como un factor de patogenicidad importante tanto de bacterias como de hongos. En el caso de microorganismos como las bacterias, la enzima ureasa les permite sobrevivir en presencia de pH bajos. En el estudio realizado por Olszewski *et al* (90), observaron que en el modelo animal utilizado, la ureasa jugaba un papel importante como factor de virulencia en la diseminación desde los pulmones hasta el SNC. Estos autores describen que el papel de ésta enzima en *Cryptococcus neoformans* es totalmente diferente al descrito para bacterias. En el caso de la infección criptocócica, describen una acumulación de células de *C. neoformans* dentro de los microcapilares en diversas partes del cerebro.

Actualmente existe un limitado número de trabajos publicados con información referente al poder patógeno de la enzima ureasa en que se consideren las dos especies de *Cryptococcus* evaluadas en esta tesis. Debido a ello, nos parece de gran importancia la aportación realizada, en la que usando un método sencillo y reproducible se comprobó que *C. neoformans* presentó mayor producción de ureasa que *C. gattii*.

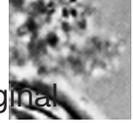
En algunos trabajos de finales de los años 80, realizados por otros autores, se ve reflejado el diferente comportamiento que tienen los teleomorfos de ambas especies, si se les compara su actividad enzimática. Tal es el caso del estudio de Booth y Vishniac en 1987 (141), en donde observaron que la ureasa de *Filobasidiella neoformans var neoformans* (*C. neoformans*) permanecía mas activa que la ureasa de *Filobasidiella neoformans var gattii* (*C. gattii*), ante la acción inhibitoria del EDTA (ácido etilendiamina-tetraacético).

En nuestro trabajo es interesante remarcar que de las tres cepas de *C. gattii* que fueron clasificadas como altas productoras de ureasa, dos fueron aisladas del medio ambiente y una del LCR de un paciente VIH.

Bajo las condiciones de éste ensayo, se observó que globalmente *C. neoformans* presenta mayor actividad ureasa que *C. gattii* con una significación estadística clara. Como los estudios de Olszewski *et al* (90) sugieren que la ureasa ayuda de forma importante, a la diseminación desde los pulmones al SNC, sería posible considerar, que en *C. gattii* co-habitan otros factores de patogenicidad, diferentes a la ureasa, que se expresan en distinta proporción a la que se puede observar en *C. neoformans*. Probablemente, *C. gattii* dispone de otro u otros factores de patogenicidad para poder lograr la diseminación hematogena desde los pulmones hasta el SNC, entre ellos cabe destacar la actividad lacasa, enzima que fue objeto de nuestro segundo trabajo de investigación.

Objetivo 2

Artículo 2: Laccase activity in *Cryptococcus gattii* strains isolates from goats. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 150-153



Laccase activity in *Cryptococcus gattii* strains isolated from goats

Eidi Alvarado-Ramírez¹, Josep M. Torres-Rodríguez¹, Maite Sellart¹ and Valerio Vidotto²

¹Research Unit on Infectious Diseases and Mycology (URMIM), Municipal Institute for Medical Research (IMIM), Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; ²Laboratorio Micologia Medica, Dipartimento Discipline Medico-Chirurgiche, Sezione Malattie Infettive, Università di Torino Corso, Turin, Italy

Summary

Cryptococcosis is a life-threatening infection in humans and animals caused by encapsulated yeasts of the genus *Cryptococcus*. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the main agents of this mycosis. Until 2002 *C. gattii* was classified as a variety of *C. neoformans* but now is accepted as an independent species. The laccase (phenoloxydase) enzyme produced by these yeasts is considered one of the main pathogenic factors for its ability to induce melanin from dihydroxyphenolic compounds. The vast majority of the studies in laccase and melanin synthesis have been developed using isolates of *C. neoformans*. The main objective of this study was to evaluate laccase activity in strains of *C. gattii*, serotype B isolated from immunocompetent goats that died of lung and disseminated cryptococcosis, in several outbreaks occurring in Spain. The laccase activities of these isolates were compared with those of other strains of *C. gattii* and *C. neoformans*. After fungal cell rupture, the supernatant of each isolate was analyzed for its laccase activity using as substrate an L-dopa 20 mM solution. The degree of enzymatic activity was assessed according to its absorbance at 450 nm and scored using Enzymatic Units (EU). The maximum values were observed in three strains of *C. gattii* from goats (EU > 12). The smallest values were observed in one environmental isolate of *C. gattii* serotype C (EU = 0.7). The highest recorded value for *C. neoformans* was 6.3 EU in a serotype A isolate from one human case of meningitis. *C. gattii* serotype B obtained from goats showed different degrees of laccase activity, being the highest in those isolated from severe outbreaks of cryptococcosis. This enzyme appears to represent a major, though nonexclusive, pathogenic factor for *Cryptococcus gattii*.

Key words

Laccase, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, Pathogenic factor, Serotypes

Actividad lacasa en cepas de *Cryptococcus gattii* aisladas de cabras

Resumen

Cryptococcus neoformans y *Cryptococcus gattii* son los principales agentes de criptococosis, una grave micosis del hombre y los animales. Entre los factores de patogenicidad de estas especies cabe destacar la lacasa (fenoloxidasas), enzima producida por éstas y otras especies fúngicas, que induce la síntesis de melanina a partir de compuestos di-hidroxifenólicos. La gran mayoría de los numerosos estudios sobre la lacasa se han efectuado con *C. neoformans*, y la información específica en *C. gattii* es muy escasa. El objetivo de este estudio ha sido evaluar la actividad de la lacasa en aislamientos de *C. gattii* serotipo B procedentes de cabras inmunocompetentes muertas por criptococosis durante varios brotes epidémicos desarrollados en Cáceres (Extremadura, España). La producción de lacasa de estos aislamientos se ha comparado con la de otros de la misma especie y también con cepas de *C. neoformans*. Se procedió a la ruptura de las levaduras por métodos físicos, y el sobrenadante de cada aislamiento se añadió a una solución 20 mM de L-dopa.

Address for correspondence:

Dr. Eidi Alvarado-Ramírez
Unitat de Recerca en Malalties Infeccioses i Micologia (URMIM)
Institut Municipal de Investigació Mèdica (IMIM)
Universitat Autònoma de Barcelona
Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona
Tel.: +34 933 160 391
Fax: +34 933 160 410
08003 Barcelona, España
E-mail: ealvarado@imim.es

Aceptado para publicación el 21 de abril de 2008

La actividad enzimática se midió a través de la absorbancia como unidades enzimáticas (EU) a 450 nm. Los valores máximos de EU se observaron en tres cepas de *C. gattii* aisladas de cabras (EU >12), mientras que el valor mas bajo se observó en una cepa ambiental de *C. gattii* serotipo C (EU = 0,7). Para *C. neoformans* la mayor actividad lacasa se obtuvo en una cepa del serotipo A aislada en un paciente con meningitis criptocócica. Todos los aislamientos de *C. gattii* procedentes de los animales muertos en brotes epidémicos mostraron diferentes grados de actividad lacasa. Esta enzima parece representar un factor de patogenicidad importante, aunque no exclusivo, en esta especie.

Palabras clave Lacasa, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, Serotipos, Factor de patogenicidad

Cryptococcosis is a worldwide life-threatening infection in humans and animals caused by the encapsulated yeasts of the genus *Cryptococcus*. The vast majority of patients have underlying immunodepressed conditions, especially AIDS [12,24]. Nevertheless several cases of cryptococcosis have been described in previously healthy persons or animals [1,5,11,13]. Speed and Dunt [18] observed that many infections occurring in healthy hosts were due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. This fact has been observed also in animals, sometimes causing outbreaks [5,17] as those occurred in Spain affecting a high number of goats [1,19]. Recently the variety *gattii* has been raised to species level [7], and currently two differentiated species are accepted: *C. neoformans*, with two varieties: *grubii* (serotype A) and *neoformans* (serotype D); and *Cryptococcus gattii* with the serotypes B and C. Most of the studies on virulence factors do not make the distinction between varieties and serotypes, referring almost exclusively to *C. neoformans*. Thus, it is of great interest to carry out individualized studies to find differences and similarities that may exist between two species so closely related. Several properties of *C. neoformans* and *C. gattii* have been considered important pathogenic factors. The ability to synthesize dark pigments when grown in media with phenolic compounds is one of them [26]. Melanin is the main pigment associated with the virulence in *C. neoformans* [9]. Melanin synthesis is catalyzed by a phenoloxylase that has been categorized as laccase on the basis of substrate specificity [2]. Laccase in the isolates of *Cryptococcus* is found attached to the cell-wall [26], and protective effects against antioxidants are attributed to the resulting melanin, lending support to the integrity of the cellular wall, protection from extreme temperatures, interference with antibody-mediated phagocytosis and lymphocyte T response [2,10]. It has also been considered a defense against various microbicide proteins [4]. Moreover, the melanization of *Cryptococcus* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin [21]. Laccase synthesis is regulated genetically, the participation of the CNLAC1 gene have already been demonstrated [25], and more recently five additional genes have been involved [23]. Chemical and biological characteristics of this enzyme have been studied, but practically only *C. neoformans* isolates have been investigated, and there is scant information on the laccase activity of *C. gattii*. *C. gattii* had been considered a species of limited geographic distribution. However, in the last few years, this species has been found in Europe, specifically in the Iberian Peninsula, producing severe infections in previously healthy goats and in one human [1,3].

The goal of this study was to investigate the activity of laccase in six pathogenic isolates of *C. gattii* serotype B, obtained from the necropsy of goats with disseminated cryptococcosis, comparing the activity of this enzyme with those of other isolates of *C. gattii* (n = 4) and *C. neoformans* (n = 4).

Materials and methods

Isolates. A total of 14 strains of *Cryptococcus* were studied. Table 1 shows their origins. The four *C. neoformans* isolates were from HIV-infected patients with meningeal cryptococcosis.

The six *C. gattii* isolates from goats studied in this work, were selectively randomized as representative of the five Spanish outbreaks previously described [19]. Isolates GR53 and GR56 were from the outbreak n° 1 with 12% of clinical prevalence. GR59 was isolated from the outbreak n° 2 with 2% of clinical prevalence. GR48 was from the cryptococcosis outbreak n° 3 with 10% of clinical prevalence. GR50 from the outbreak n° 4 with prevalence not determined and, finally, strain GR52 was from outbreak n° 5 with clinical prevalence 2.5% [19].

Isolates were maintained in the URMIM collection in skimmed milk at -20 °C until its use, at which time they were grown on Sabouraud agar with chloramphenicol. The serotypes were confirmed by agglutination with antiserum from a Crypto Check kit, Iatron Laboratories (Tokyo, Japan).

Table 1. Serotypes and origin of 14 isolates of *C. gattii* and *C. neoformans* analyzed for laccase activity.

Isolate	Species	Serotype	Origin	Country	Laccase EU*
A146	<i>C. neoformans</i>	A	Human CSF	Spain	1.7
A74	<i>C. neoformans</i>	A	Human CSF	Spain	6.3
D297	<i>C. neoformans</i>	D	Human CSF	Spain	3.0
D12	<i>C. neoformans</i>	D	Human CSF	Spain	4.7
B432	<i>C. gattii</i>	B	Human CSF	Mexico	2.7
4506	<i>C. gattii</i>	B	Environment	Australia	5.7
GR52	<i>C. gattii</i>	B	Goat brain	Spain	1.0
GR59	<i>C. gattii</i>	B	Goat lung	Spain	2.7
GR48	<i>C. gattii</i>	B	Goat lung	Spain	4.7
GR50	<i>C. gattii</i>	B	Goat lung	Spain	12.3
GR53	<i>C. gattii</i>	B	Goat lung	Spain	17.7
GR56	<i>C. gattii</i>	B	Goat intestine	Spain	21.0
H0058	<i>C. gattii</i>	C	Environment	Colombia	0.7
BV19	<i>C. gattii</i>	C	Human CSF	Venezuela	2.0

*EU: Enzymatic Units

Cell rupture. The isolates were grown for 48 h at 30 °C in Sabouraud agar and immediately cultured in McVeigh & Morton liquid medium [15]. Then they were incubated in slow agitation for 24 h at 25 °C. Subsequently, the cultures were divided into two equal fractions; one was used as control by inactivating the fungal cells at 56 °C for 60 min. Yeast cells were centrifuged at 6.000 *g* for 10 min at 4 °C and then were resuspended in sterile PBS for two rinses. A yeast concentration of 10⁸ FCU/ml was resuspended in PBS and cell rupture was carried out in a super-mixer agitator (*Lab-line Instruments, INC.* USA) with 0.45-0.60 mm ϕ glass pearls (Sartorius, Germany). A minimum of ten cycles were performed (with intervals of 2 min in cold bath) until it was microscopically confirmed that more than 80% of the cells had ruptured. The mixture was filtered in Whatmann (N° 1) sterile paper and centrifuged at 20,000 *g* for 20 min at 4 °C. The supernatant was conserved at 4 °C until enzyme determination, performed within a maximum of 72 h.

Controls. The supernatants of the ruptured cells that had been previously heat-inactivated were used as negative controls.

Due to the possibility of auto-oxidation of the substrate, a buffer solution of 20 mM L-DOPA-ring-d₃ in a KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0.5 M, pH 6.8, was used, without the supernatant, to control the stability of the reactive (control L-Dopa).

Phenoloxydase (Laccase) assay. The method described previously by Prabhakaran et al. for *Mycobacterium leprae* [16] was adapted to *Cryptococcus* cells and applied twice for reproducibility study. The activity of laccase was measured by the accumulation of the intermediary chromogenic products that are produced during oxidation of the L-Dopa. Three ml of the supernatant of each isolate mixed with 200 μ l of L-Dopa 20 mM solution were incubated in slow agitation at 25 °C for 120 min. Every 10 min from the moment in which both reactives were mixed, 200 μ l of solution were taken and deposited in a flat-bottom microplate. The maximum absorbance of the dopachrome was measured at 450 nm by using a spectrophotometer (Labsystems MultiSkan MS, Finland). The enzymatic activity necessary to increase the absorption value by 0.03 in the indicated conditions, at 30 °C and pH 6.8 was considered as one enzymatic unit (EU) of laccase. For the final calculation of the EU of each strain, the modified formula, based on the proposal by Vidotto et al. [22] was applied:

$$(A_{450_{120\text{ min}}} - A_{450_{0\text{ min}}}) / 10^8 \text{ cells/ml} = (\text{EU}/10^8 \text{ cells/ml})$$

Statistical analysis. The Mann-Whitney U test was applied to evaluate the individual differences between the values obtained with goats' and reference isolates.

Results

The stability control of the substrate showed that L-Dopa auto-oxidation ($A_{450} = 0.04$) was not produced. Duplicates give similar values with a maximum of ± 0.02 of absorbance changes. When the absorbance increased equal to or greater than 0.03 (EU = 1), the development of a pink pigment was observed in the tube containing the mix. These changes were observed in all tested supernatants, but not in the inactivated-yeast control supernatants. The shortest time to observe the laccase activity was found in two *C. gattii* serotype B supernatants, from goats' isolates, both from the same outbreak (GR56 and GR53), which increased their absorbance after 10 minutes of incubation. These strains reach also the highest values of EU. The figure shows the absorbance values of the supernatants from the 14 strains analyzed at 0 min and 120 min. Maximum absorbance values were obtained in three goat isolates of *C. gattii*: GR56, GR53, and GR50 (Table 2). On applying the above-mentioned formula, the values 21.0 EU, 17.7 EU and 12.3 EU were obtained for these strains, respectively (Figure). Two other non-goat isolates showed high enzymatic activity, one clinical isolate of *C. neoformans* serotype A (6.3 EU) and one environmental isolate of *C. gattii* (5.7 EU) but in any case clearly lower than the goat *C. gattii* mentioned strains ($p \geq 0.05$). The lowest laccase activity was observed in strain H0058 of *C. gattii*

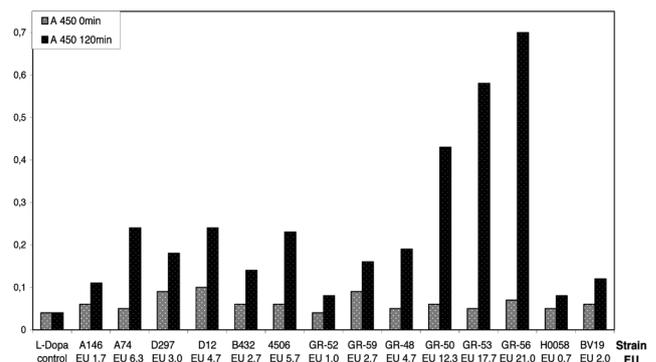


Figure. Absorbance values (450nm) of 14 isolate of *C. gattii* and *C. neoformans* supernatants at 0 and 120 min. One Enzymatic unit (EU) corresponding to absorbance increasing of 0.03.

Table 2. Absorbance values (450nm) of the supernatants from the 14 isolates of *Cryptococcus* spp, analyzed over the course of 0 min to 120 min.

Isolate	Species	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
A146	<i>C. neoformans</i>	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.09	0.11	0.11
A74	<i>C. neoformans</i>	0.05	0.06	0.08	0.10	0.11	0.11	0.13	0.15	0.18	0.18	0.24	0.24	0.24
D297	<i>C. neoformans</i>	0.09	0.10	0.10	0.11	0.11	0.12	0.12	0.13	0.14	0.14	0.18	0.18	0.18
D12	<i>C. neoformans</i>	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14	0.15	0.15	0.16	0.16	0.17	0.18	0.24	0.24
B432	<i>C. gattii</i>	0.06	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.12	0.13	0.13	0.14	0.14
4506	<i>C. gattii</i>	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.12	0.13	0.13	0.15	0.16	0.19	0.23	0.23
GR52	<i>C. gattii</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.08
GR59	<i>C. gattii</i>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.11	0.11	0.12	0.12	0.13	0.14	0.16	0.16
GR48	<i>C. gattii</i>	0.05	0.05	0.07	0.08	0.09	0.10	0.12	0.12	0.14	0.14	0.15	0.17	0.19
GR50	<i>C. gattii</i>	0.06	0.06	0.07	0.10	0.15	0.20	0.27	0.30	0.35	0.38	0.41	0.43	0.43
GR53	<i>C. gattii</i>	0.05	0.08	0.13	0.18	0.23	0.29	0.32	0.35	0.38	0.42	0.47	0.57	0.58
GR56	<i>C. gattii</i>	0.07	0.11	0.16	0.22	0.28	0.34	0.39	0.43	0.48	0.52	0.65	0.70	0.70
H0058	<i>C. gattii</i>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.07	0.08
BV19	<i>C. gattii</i>	0.06	0.06	0.07	0.07	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.11	0.12
SCD*	-	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04

*SCD: Stability control of L-Dopa.

serotype C isolate from environmental sources in Colombia and also in one *C. gattii* strain (GR52) isolated from a goat of the less severe outbreak of cryptococcosis.

Discussion

Melanin production has been implicated in *C. neoformans* virulence since the 1980s when it was confirmed that non-melanized mutant strains presented attenuated virulence when they were inoculated in mice, in comparison with wild melanin-containing isolates [8,9]. Practically all of the studies on the features of phenoloxidase activity in *Cryptococcus* have been carried out on *C. neoformans* species, in many cases without specifying either variety or serotype; nevertheless, in 1979, Nurudeen and Ahearn [14] observed that the substances regulating the enzyme correlated with serotype. Ikeda et al. [6], studying several *Cryptococcus* species different to *C. neoformans*, in an epinephrine medium, detected a laccase isoenzyme in ruptured cells of *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus curvatus*, demonstrating that this enzyme is not exclusive to *C. neoformans* and is a variable factor for other *Cryptococcus* species. In the present study, it was shown that three of the pathogenic strains of *C. gattii* serotype B (GR56, GR53, GR50) that led to the highest epidemic outbreaks of cryptococcosis in healthy goats in Spain [1,20], also presented the highest levels of laccase activity in the first 30 min of incubation. Nevertheless, one of the goat strains isolated from a brain tissue sample (GR52) showed very low activity of this enzyme (1 EU).

Both isolates of *C. gattii* serotype C also presented low phenoloxidase activity, particularly the environmental isolate sample (H0058). In an earlier study, this strain showed lower pathogenicity when it was inoculated intraperitoneally in immunocompetent mice [20].

The analysis of the results given by *C. gattii* serotype B strains of distinct goats with cryptococcosis, showed that the two isolates that showed a high degree of laccase activity were isolated from animals coming from the epidemic outbreak with the higher clinical prevalence of cryptococcosis (12.5%). By contrast, the isolate GR52 presenting the lowest value of laccase activity was isolated from the outbreak with reduced number of clinical prevalence (2.5%).

The laccase activity of *C. gattii* is variable and it must be considered that the enzyme should be one of the main pathogenicity factors, produced by this fungus but probably not the only one. Further studies need to be carried out in order to determine whether the chemical and genetic characteristics of laccase present in *C. gattii* are different from those in *C. neoformans*.

This study was supported by grant PI02/0413 from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Spanish Ministry of Health. We thank Josep M. Manresa for statistical analysis.

References

- Baró T, Torres-Rodríguez JM, Hermoso de Mendoza M, Morera Y, Alía C. First Identification of Autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 458-461.
- Casadevall A, Perfect RJ. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC, ASM Press, 1998.
- Colom MF, Frasés S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, Sánchez M, Torres-Rodríguez JM. First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4538-4550.
- Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med Mycol* 1999; 37: 175-181.
- Duncan C, Stephen C, Lester S, Bartlett KH. Follow-up study of dogs and cats with asymptomatic *Cryptococcus gattii* infection. *Med Mycol* 2005; 43: 663-666.
- Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1214-1218.
- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduriansis* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremenomycetidae). *Taxon* 2002; 51: 804-806.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Popkin TJ. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J Bacteriol* 1982; 150: 1414-1421.
- Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. Encapsulation and melanin production as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1986; 51: 218-223.
- Liu L, Tewari RP, Williamson PR. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun* 1999; 67: 6034-6039.
- Mitchell DH, Sorrell TC, Allworth AM, Heath CH, McGregor AR, Papanoum K, Richards MJ, Gottlieb T. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 611-616.
- Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS -100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Med Rev* 1995; 8: 515-548.
- Núñez M, Peakock JE, Chin R Jr. Pulmonary cryptococcosis in the immunocompetent host. Therapy with oral fluconazole: a report of four cases and review of the literature. *Chest* 2000; 118: 527-534.
- Nurudeen TA, Ahearn DG. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 724-729.
- Parks LC. Handbook of Microbiological Media. Boca Raton, CRC press, 1993.
- Prabhakaran K, Harris EB, Kirchheimer WF. Effect of inhibitors on phenoloxidase of *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol* 1969; 100: 935-938.
- Raso TF, Werther F, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol* 2004; 42: 355-362.
- Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 28-36.
- Torres-Rodríguez JM, Hermoso de Mendoza M, Alvarado-Ramírez E, Segura-Roca G. Cryptococcosis by *Cryptococcus gattii* in immunocompetent goats in Spain and review of the literature. *Acta Sci Vet* 2006; 34: 245-253.
- Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Corominas JM, Castañeda E. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompetent mouse model. *Med Mycol* 2003; 41: 59-63.
- Van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3394-3400.
- Vidotto V, Defina N, Pugliese A, Aoki S, Nakamura K, Takeo K. Effect of different K⁺ concentrations on *Cryptococcus neoformans* phenoloxidase activity. *Mycopathologia* 2002; 156: 171-176.
- Walton FJ, Idnurm A, Heitman. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2005; 57: 1381-1396.
- Waters L, Nelson M. Cryptococcal disease and HIV infection. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 2633-2644.
- Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 1994; 176: 656-664.
- Zhu X, Gibbons J, Garcia-Rivera J, Casadevall A, Williamson PR. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun* 2001; 69: 5589-5596.

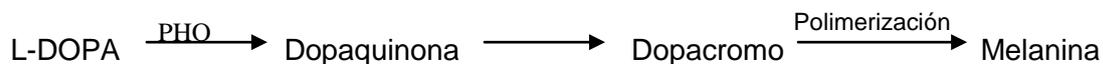
5.2 Objetivo 2

Estudiar la actividad lacasa (fenoloxidasa) de cepas de *C. gattii* aislados de cabra con criptococosis y relacionarla con su patogenicidad.

5.2.1 Artículo 2: Laccase activity in *Cryptococcus gattii* strains isolates from goats. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 150-153.

Otro de los factores de patogenicidad de gran importancia atribuidos a *Cryptococcus neoformans*, es la capacidad de producir melanina por la actividad enzimática de la enzima lacasa (fenoloxidasa). La lacasa del género *Cryptococcus* se encuentra unida a la pared celular (93) y a la melanina resultante de su actividad, se le atribuyen efectos de protección contra los antioxidantes, dando soporte a la integridad de la pared celular fúngica, protección frente a temperaturas extremas, interferencia con la fagocitosis mediada por anticuerpos y contra la respuesta de los linfocitos T (38,94).

La lacasa es una enzima fenoloxidasa, que actúa en presencia de compuestos dihidroxifenólicos como las catecolaminas. La vía de melanogénesis en *Cryptococcus* propuesta por Buchanan y Murphy (142), explica que la catecolamina L-Dopamina al ser oxidada por la lacasa, pasa a ser un compuesto poco estable (Dopaquinona) que al perder 2 átomos de hidrógeno forma el compuesto coloreado llamado Dopacromo. Este compuesto es de color rosa claro y se forma previamente a la polimerización de la melanina y tiene un espectro de absorción cercano a 450nm.



Al igual que ocurre con la información asequible de otros factores de patogenicidad de *Cryptococcus*, la gran mayoría de los estudios publicados se han realizado sobre los factores de virulencia sin distinción entre las variedades y serotipos, refiriéndose casi exclusivamente a *C. neoformans*. Por ello es de gran interés realizar estudios individualizados que permitan conocer las diferencias y similitudes que existen entre estas dos especies tan cercanas.

C. gattii se había considerado de distribución geográfica limitada. No obstante en los últimos años, se ha encontrado en Europa, específicamente en la península Ibérica, produciendo infecciones graves en animales (41) y posteriormente en casos humanos (42). En ninguno de estos sujetos, se hallaron indicios de inmunosupresión, y consideramos de gran interés, analizar factor de patogenicidad, en un grupo representativo de cepas provenientes de cabras con criptococosis.

Los brotes descritos en la provincia de Cáceres ocurrieron en diferentes localidades (143). Tanto la prevalencia clínica como el tipo de órganos de las cabra infectadas fue variable. Y en base a ello fueron escogidas las cepas de *C. gattii* serotipo B con las cuales se trabajó en este estudio.

Para este fin, de un total de 13 cepas de *C. gattii* serotipo B provenientes de los 5 brotes de la provincia de Cáceres, se escogieron 6. Cada una de ellas, fue aislada de una cabra autopsiada de cada brote y una cepa adicional, proveniente del brote nº 1 donde hubo mayor prevalencia clínica y que además había sido recuperada del intestino de una de las cabras, órgano que no es comúnmente afectado en casos de criptococosis diseminada (Tabla 10).

Aislados	Especies	Origen	Localización del brote	Nº de brote epidémico	% prevalencia
GR-52	<i>C. gattii</i>	Cerebro	Casas de Millan	5	2,5
GR-59	<i>C. gattii</i>	Pulmón	Madroñera	2	2
GR-48	<i>C. gattii</i>	Pulmón	Pescueza	3	10
GR-50	<i>C. gattii</i>	Pulmón	Serradilla	4	No determinada
GR-53	<i>C. gattii</i>	Pulmón	Vera	1	12
GR-56	<i>C. gattii</i>	Intestino	Vera	1	12

Tabla 10: *Cryptococcus gattii* provenientes de cabras utilizadas en el estudio de la actividad lacasa (143).

El resto de cepas estudiadas en este trabajo, se escogieron como referencia para obtener un punto de comparación de la actividad lacasa; por lo tanto se eligieron dos cepas de cada serotipo A, B, C y D. En la Tabla 11 se muestran las diferentes cepas incluidas, algunas de personas infectadas con VIH y otras aisladas del medio ambiente.

Aislado	Especie	Serotipo	Origen	País
A146c	<i>C. neoformans</i>	A	LCR	España
A74c	<i>C. neoformans</i>	A	LCR	España
D297c	<i>C. neoformans</i>	D	LCR	España
D12c	<i>C. neoformans</i>	D	LCR	España
B432c	<i>C. gattii</i>	B	LCR	Méjico
4506	<i>C. gattii</i>	B	ambiental	Australia
H0058	<i>C. gattii</i>	C	Arbol	Colombia
BV19	<i>C. gattii</i>	C	LCR	Venezuela

Tabla 11: Especies, serotipos y origen de 8 aislamientos de *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans* utilizados para comparar la determinación de la actividad lacasa.

Debido a que la lacasa del género *Cryptococcus* se encuentra unida a la pared celular fúngica (93), era necesario un método que nos permitiera dejar libre la enzima, manteniendo su viabilidad. La técnica empleada por Prabhakaran *et al* (144) originalmente diseñada para estudiar la fenoloxidasas en *Mycobacterium leprae* fue adaptada para trabajar con las células de *Cryptococcus*. En efecto, se comprobó que provocando una ruptura mecánica de las células mediante agitación, se podía trabajar con el sobrenadante de estas células rotas y fue posible evidenciar la actividad lacasa, al realizar una reacción colorimétrica que se podía medir con un espectrofotómetro.

La melanina se produce en presencia de compuestos dihidroxifenólicos o poliaminobencénicos, por lo cual utilizamos de sustrato para la lacasa, una solución de L-Dopamina (L-Dopa). Esta catecolamina, una vez puesta en suspensión, tiende a autooxidarse, oscureciendo la solución. Para evitar interferencias en los valores de absorbancia, incluimos en el ensayo una solución de L-Dopa resuspendida, observándose que no hubo aumentos en la absorbancia que fueran producto de la autooxidación, con lo cual nos aseguramos de que el reactivo era estable (Figura 11).

Por otro lado, para comprobar que en efecto, la enzima se encontraba realmente viable en el sobrenadante de las células fúngicas rotas, se procedió a estudiar una alícuota de ésta misma solución celular para cada una de las cepas, pero inactivada con calor a 56°C x 60 min. Finalmente, no se registró ninguna actividad enzimática en ésta solución, indicando que la enzima se encontraba viable exclusivamente en la alícuota de la solución sin calentar.

Una vez realizado el ensayo, se procedió a calcular las unidades enzimáticas (UE) de cada cepa, mediante una fórmula matemática basada en la propuesta de una publicación anterior realizada por Vidotto *et al* (145). Evaluando el espectro de absorción al tiempo inicial (0 min) y al tiempo final (120 min) pudimos definir que una

UE producía incremento en la absorbancia de 0.03, incubada a 30°C con pH 6.8. Por lo tanto, la formula resultante fue la siguiente:

$$(A_{450_{120 \text{ min}}} - A_{450_{0 \text{ min}}}) / 10^8 \text{ células/mL} = (\text{EU}/10^8 \text{ células/mL})$$

En la Tabla 12 se pueden observar los valores de UE obtenidas para cada cepa.

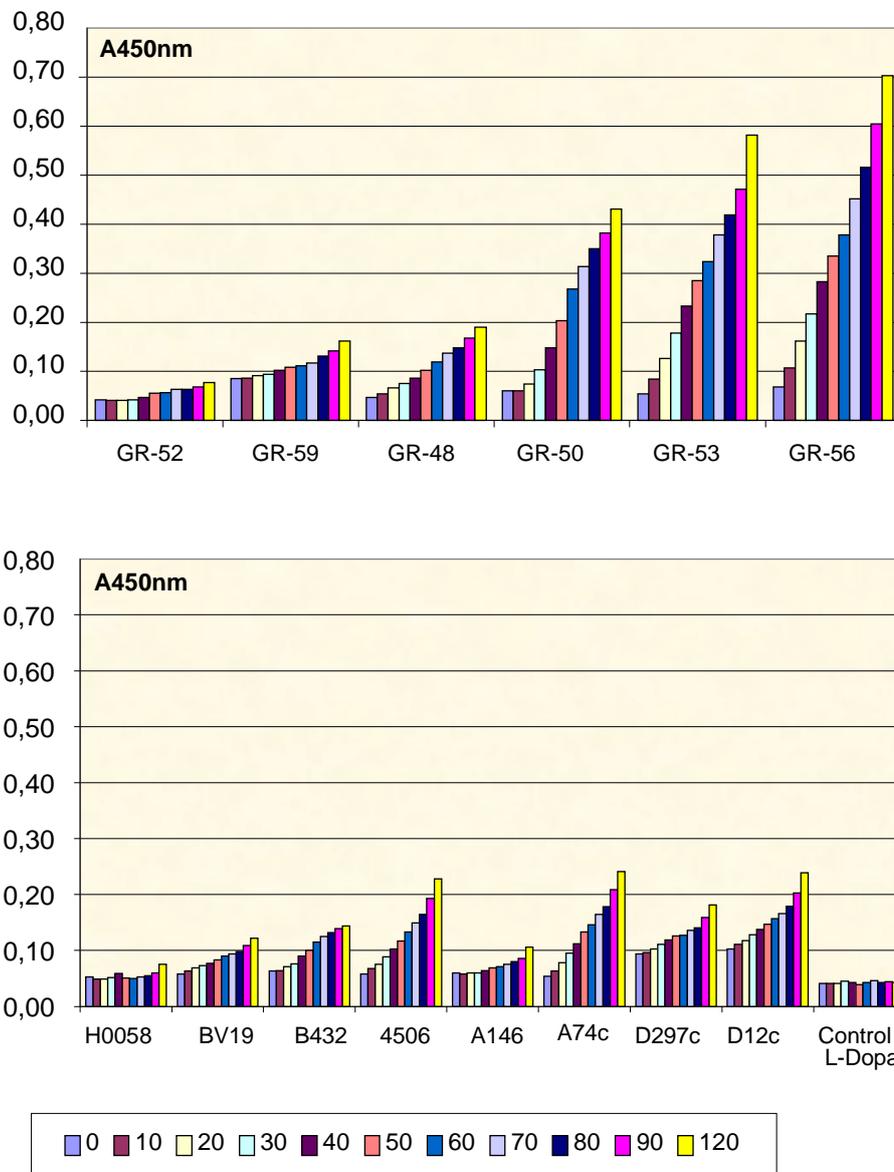
Aislamientos	Especies	Serotipo	Origen	País	UE lacasa
A146c	<i>C. neoformans</i>	A	LCR	España	1.7
A74c	<i>C. neoformans</i>	A	LCR	España	6.3
D297c	<i>C. neoformans</i>	D	LCR	España	3.0
D12c	<i>C. neoformans</i>	D	LCR	España	4.7
B432c	<i>C. gattii</i>	B	LCR	Méjico	2.7
4506	<i>C. gattii</i>	B	Ambiente	Australia	5.7
GR-52	<i>C. gattii</i>	B	Cerebro cabra	BE nº5	1.0
GR-59	<i>C. gattii</i>	B	Pulmón cabra	BE nº2	2.7
GR-48	<i>C. gattii</i>	B	Pulmón cabra	BE nº3	4.7
GR-50	<i>C. gattii</i>	B	Pulmón cabra	BE nº4	12.3
GR-53	<i>C. gattii</i>	B	Pulmón cabra	BE nº1	17.7
GR-56	<i>C. gattii</i>	B	Intestino cabra	BE nº1	21.0
H0058	<i>C. gattii</i>	C	Arbol	Colombia	0.7
BV19	<i>C. gattii</i>	C	LCR	Venezuela	2.0

Tabla 12: Especie, serotipos y origen de 14 aislados de *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans*. Unidades Enzimáticas (UE) de la enzima lacasa. BE: Brote Extremeño.

Debido a que el número de cepas evaluadas provenientes de los brotes caprinos no es del todo representativo, no es posible establecer una relación directa entre las UE y el porcentaje de prevalencia clínica de cada brote. A pesar de ello, estos resultados sugieren que existe una variabilidad en la actividad lacasa de las especies *C. gattii* y *C. neoformans*. Ya que a pesar de haber sido cultivadas y evaluadas bajo las mismas condiciones, no muestran las mismas unidades enzimáticas.

Cabe destacar, el valor de las UE obtenidas para tres cepas provenientes de los brotes caprinos (GR-56, GR-53, GR-50), los cuales fueron al menos dos veces más elevados que el mayor valor encontrado en las cepas de referencia no-cabras. El nivel de prevalencia clínica del brote nº 1 fue 12%, y las cepas GR-56 y GR-53, que provienen de esos animales presentaron valores elevados de lacasa. Todas las cepas evaluadas presentaron valores crecientes de actividad enzimática a lo largo del tiempo (0-120 min), tal como muestra la Figura 11.

Figura 11: Incremento de la actividad lacasa a lo largo del tiempo (0-120 min). A450nm



Estas 3 cepas aisladas de cabra, fueron estudiadas en el ensayo anteriormente expuesto en ésta tesis. Curiosamente se puede observar que las cepas (GR50, GR53, GR56), fueron clasificadas como bajas productoras de ureasa y que según nuestros resultados poseen valores de UE altos para lacasa. Por lo que se puede sugerir que los factores de patogenicidad de éstas levaduras se presentan en diferentes grados o intensidades.

Es indudable que la producción de melanina es un factor de patogenicidad importante de *C. gattii* y de *C. neoformans* (9,38). A pesar de que los resultados obtenidos sugieren que *C. gattii* aislado en brotes epidémicos, presentaría mayor actividad lacasa, es necesario realizar otros estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, usando cepas con diferentes actividades enzimáticas , para poder establecer una relación mas firme entre la menor o mayor actividad lacasa y la virulencia de las cepas.

Objetivo 3

Artículo 3 [en preparación] Estudio de la variabilidad del gen CNLAC1 entre *Cryptococcus gattii* y *Cryptococcus neoformans*

5.3 Objetivo 3

Obtener un segmento del gen CNLAC1 específico de *Cryptococcus gattii*, serotipos B y C, que intervenga en la síntesis de la enzima lacasa.

5.3.1 Artículo 3 [en preparación]: Estudio de la variabilidad del gen CNLAC1 entre *Cryptococcus gattii* y *Cryptococcus neoformans*

5.3.1.1 Introducción

Cryptococcus gattii es una nueva especie, segregada del grupo de levaduras de *Cryptococcus neoformans*, debido a las diferentes características fenotípicas, epidemiológicas y genéticas que posee. Esta nueva especie presenta una distribución geográfica menor a la que inicialmente se describió para *C. neoformans*. Inicialmente, *C. gattii* se aisló de pacientes no inmunosuprimidos y en zonas de clima tropical. A lo largo de los años han ido surgiendo cepas provenientes de muestras ambientales de suelo y árboles en diferentes partes del mundo, en pacientes inmunocompetentes con criptococosis (12) y regiones consideradas no-tropicales (43). En España a pesar de que hasta ahora no se ha aislado de la naturaleza, se han descritos casos autóctonos de criptococosis tanto humana (42) como animal (41).

La patología producida por *C. gattii*, se asemeja en muchos casos a la producida por los patógenos primarios, puesto que afecta a sujetos inmunocompetentes sin ninguna enfermedad inmune de base (45). Cada vez se describen más casos de criptococosis producidas por esta especie, y que además emergen en zonas donde antes no habían sido descritas. Upton *et al* (43) muy recientemente, describieron el primer caso de criptococosis causada por *C. gattii*, en un paciente masculino leucémico residente de Washington D.C. (Estados Unidos), sin antecedentes descritos de desplazamiento fuera de su zona residencial.

Por lo tanto, la criptococosis producida por *C. gattii* esta siendo considerada como enfermedad emergente y este hecho induce a realizar mayores estudios de los factores de patogenicidad de ésta especie. La enzima lacasa, es considerada uno de los más importantes factores de patogenicidad y tanto la actividad enzimática como el gen que codifica su síntesis, el gen CNLAC1 ha sido y continúan siendo objeto de diversos estudios (25,96,146).

Varios autores han investigado en *Cryptococcus neoformans*, la variabilidad del gen CNLAC1 con diversas finalidades. Williamson clonó y secuenció este gen (96), utilizando una cepa de *Cryptococcus neoformans* serotipo D. En su trabajo describe que el gen de la lacasa está formado por una región que codifica a una estructura polipeptídica de 624 aminoácidos y que contiene 14 intrones con longitudes variables desde 52 hasta 340 pares de bases (pb). La secuencia completa obtenida por él, para el CNLAC1 está ubicada en la base de datos del *GenBank* *accension* nº L22866.

Salas *et al* (146) realizaron estudios acerca del papel del gen de la lacasa en la virulencia de *Cryptococcus neoformans* en ratones con criptococosis. Estudiaron cepas mutantes melanina negativa, las inocularon a ratones y observaron que estas cepas mutadas presentaban menos virulencia que las cepas con el gen CNLAC1 salvaje. Estos autores encontraron que había una relación directa entre el producto del gen de la lacasa y la mayor o menor virulencia de las cepas.

Por otro lado, Petter *et al* (25) utilizaron secuencias del gen CNLAC1 para investigar homología entre géneros de basidiomicetos con actividad de lacasa conocida. *Filobasidiella neoformans*, forma sexual o teleomorfa de *Cryptococcus neoformans*, fue el único basidiomiceto patógeno evaluado por estos autores. Para comprobar posibles homologías con otros basidiomicetos, secuenciaron varias regiones del gen. Observaron que hubo homología entre *Cryptococcus podzolicus* y *F. neoformans* serotipo B y C, no así con los serotipos A y D.

Xu *et al* (26) propusieron diferentes hipótesis del origen y evolución del serotipo AD de *Cryptococcus neoformans*, basándose en la variabilidad de las secuencias del gen de la lacasa.

Tanaka *et al* (147), secuenciaron fragmentos de aprox. 600pb, ubicados en la posición 3071 y 3650 de la secuencia del CNLAC1 de *GenBank* (*accension* nº L22866) (96). En 64 cepas, de los 4 serotipos tanto de *C. neoformans* como de *C. gattii*, las nuevas secuencias de éste gen obtenidas mostraron mayor homología con las cepas de serotipo A y D; y menos con las cepas de serotipo B y C.

Los genes de *Cryptococcus* son más ricos en contenido de intrones que los de cualquier otro hongo (148). Al ocurrir la transcripción del ADN, como en cualquier célula eucariota, y producirse el transcrito, éste contiene tanto intrones como exones. El

transcrito es procesado a ARNm por el fenómeno de *splicing* y ciertos intrones son eliminados. Para el caso de *Cryptococcus*, Sharpton *et al* (148), sugieren que la pérdida de intrones en el transcrito es un evento raro, lento y poco frecuente y que por lo tanto, el resultado son genes con gran cantidad de intrones.

La producción de melanina es un factor importante en la patogenicidad de *C. gattii* y de *C. neoformans* (9,38). En el estudio anteriormente expuesto en ésta tesis, en donde se midió la actividad enzimática de la lacasa en *Cryptococcus*, se observó que en el número de cepas probadas, éste factor de patogenicidad se expresaba diferencialmente. Según la especie evaluada en el ensayo, se observó mayor actividad de lacasa en 3 aislados de *C. gattii*. A pesar de las limitaciones de éste estudio, resultaba interesante suponer, que si existía diferencia en los fenotipos de la producción de la lacasa, también ocurría en los genotipos, específicamente en el gen CNLAC1 responsable de su síntesis.

Por lo tanto el objetivo de este estudio fue comprobar la variabilidad del gen de la lacasa CNLAC1, mediante la identificación de un fragmento de nucleótidos que fuera exclusivo en *Cryptococcus gattii*, serotipos B y C. Para este fin, aislados de diferente origen de *Cryptococcus neoformans* y de *C. gattii*, fueron incluidas en éste trabajo (Tabla 13) y luego, para poder afirmar que el fragmento presente solo en *C. gattii*, es transcrito a ARNm, se procedió a comprobar esto mediante la técnica de RT-PCR.

5.3.1.2 Materiales y Métodos

5.3.1.2.1 Aislados usados

Se estudiaron un total de 55 cepas de *Cryptococcus*. En la Tabla 5 se muestra el origen y serotipo de las cepas evaluadas. Veintidos *C. gattii* serotipo B, cuatro *C. gattii* del serotipo C y 29 *C. neoformans* (14 serotipo A y 15 serotipo D) fueron usadas. La cepa de *Candida krusei* ATCC6258, fue utilizada como control negativo. La cepa TIMM1315 correspondiente a *C. gattii* serotipo C, proveniente de la colección japonesa *Teikyo University Institute Medical Mycology* (147), fue incluida como cepa de referencia, al ser utilizada su secuencia de nucleótidos para crear los iniciadores (*primers*) usados en este estudio.

CEPAS	SEROTIPO	ESPECIE	ORIGEN	País
A17c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A19c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A74c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A146c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A148c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A469c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A473c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	Cuba
A101c	A	<i>C. neoformans</i>	BAL	Cuba
A102c	A	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
A122a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
A129a	A	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	Chile
A145a	A	<i>C. neoformans</i>	Árbol	Chile
A177a	A	<i>C. neoformans</i>	Árbol	Turquía
A178a	A	<i>C. neoformans</i>	Árbol	Turquía
B48c	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B50c*	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B52c	B	<i>C. gattii</i>	LCR cabra	España
B53c	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B56c	B	<i>C. gattii</i>	Intestino cabra	España
B58c	B	<i>C. gattii</i>	LCR cabra	España
B59c	B	<i>C. gattii</i>	Pulmón cabra	España
B60c	B	<i>C. gattii</i>	LCR cabra	España
B432c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Méjico
B470c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	España
B163c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B170c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B171c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B172c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B173c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B174c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Brasil
B331c	B	<i>C. gattii</i>	LCR	Colombia
B46a*	B	<i>C. gattii</i>	Avispero	Uruguay
B73a	B	<i>C. gattii</i>	Heces murciélago	Brasil
B74a	B	<i>C. gattii</i>	Árbol	Brasil
B162a	B	<i>C. gattii</i>	Árbol	Perú
4506	B	<i>C. gattii</i>	Ambiental	Australia
C24a*	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Brasil
BV19	C	<i>C. gattii</i>	LCR	Venezuela
H0058	C	<i>C. gattii</i>	Árbol	Colombia
TIMM 1315*	C	<i>C. gattii</i>	Desconocido	Japón
D21c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D35c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D38c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D145c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D179c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D181c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D182c	D	<i>C. neoformans</i>	Sangre	España
D183c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D297c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D9a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
D11a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
D12c	D	<i>C. neoformans</i>	LCR	España
D16a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
D18a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España
D71a	D	<i>C. neoformans</i>	Heces paloma	España

Tabla 13: Cepas (n=55) utilizadas en el estudio de la variabilidad del gen CNLAC1. LCR: líquido cefalorraquídeo, BAL: lavado broncoalveolar, HC: Hemocultivo. *Cepas de *C. gattii* probadas con RT-PCR, escogidas al azar.

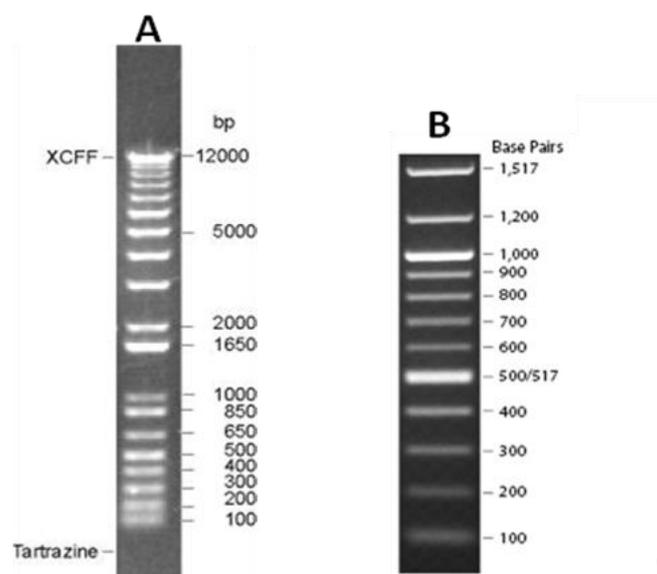
Todas las cepas, excepto TIMM1315, pertenecen a la colección de URMIM, se encuentran guardadas a -20°C y suspendidas en leche desnatada estéril. La serotipificación de las cepas se realizó mediante el kit *Crypto Check* (Iatron Laboratories Tokyo, Japan).

Los iniciadores o *primers* fueron creados mediante el programa *Primer.exe*. Las secuencias de ácidos nucleicos usadas, fueron tomadas de la base de datos *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (149) y fueron alineadas mediante el programa informático *BLAST*.

5.3.1.2.2 Patrones de pares de bases utilizados.

En éste trabajo se utilizaron dos patrones de pares de bases:

- A) *TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen™) desde 100 a 12000 bp.
- B) *TrackIt™ 100 bp Plus DNA Ladder* (Invitrogen™) desde 100 a 1517 bp



5.3.1.2.3 Obtención y diseño de los iniciadores (*primers*)

Basándonos en el estudio descrito por Tanaka *et al* (147) en el que utilizaron cepas de todos los serotipos de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, se escogieron las cepas de serotipo B y C con el siguiente número de identificación de la base de datos japonesa de ADN (*DDBJ accession number*) (Tabla 14) :

Cepa	<i>DDBJ accession n° Serotipo B</i>	<i>DDBJ accession n° Serotipo C</i>	Cepa
CN13	AB184041	AB184050	NAL070
484	AB184042	AB184051	IFM5859
484(mel)	AB184043	AB184052	IFM5873
571	AB184044	AB184053	IFM5875
643	AB184045	AB184054	IFM5875(mel)
741	AB184046	AB184055	TIMM1315*
891	AB184047	AB184056	TIMM1315-2
1024	AB184048		
JN	AB184049		

Tabla 14: DDBJ accession number usadas para la obtención de los iniciadores forward y reverse (150). *Cepa TIMM1315, *C. gattii* serotipo C utilizada en el presente estudio como cepa de referencia.

La secuencia de estos 16 aislados de *Cryptococcus gattii* (*C. bacillisporus*), fueron alineados con el programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* para su posterior análisis. El programa informático *BLAST* (151) facilita la búsqueda de similitudes en un número variable de secuencias de nucleótidos, permitiendo visualizar fácilmente regiones completas de pares de bases semejantes unas de otras y haciéndolas accesibles para poder utilizarlas en diferentes técnicas.

Luego de haber obtenido las regiones similares en todas las secuencias escogidas, fue usado el programa *Primer.exe*. Finalmente, se obtuvo el *primer* iniciador (*forward*) con una longitud de 19 pb, y localizado en 88-106 pb (Invitrogen™: CGC ATA TCT CTC GAC AAC C). El *primer* complementario (*reverse*) presentó 22 pb de longitud (Invitrogen™: ACA CGA CAA CTC TCT CTC TCT C) que correspondieron a la región comprendida entre 528-547 pb. Por lo tanto, la longitud esperada para el fragmento amplificado fue de aproximadamente 500 pb.

5.3.1.2.4 Extracción del ADN genómico

Las cepas de *Cryptococcus* fueron cultivadas en medio de Sabouraud líquido glucosado a 30°C por 72h, en agitación suave (Ika-Schüttler MTS 2). Posteriormente todo el cultivo fue recuperado en tubos (*Falcon Blue Max* 50 mL) y se centrifugó a 6000 g x 10 min. Las células fueron lavadas 2 veces con agua bidestilada estéril. El volumen final de 1 mL de ésta suspensión celular, fue puesto en contacto con perlas de vidrio estériles 0.40-0.60 mmø (Sartotins Ref.BBI-8541701) y fueron agitadas en un vortex (*Heiddph Reax2000*) por aproximadamente 30 minutos, realizando 15 ciclos de 2 min cada uno y manteniendo siempre los tubos a 4°C.

Al observar al microscopio óptico con azul de metileno, que aproximadamente 90% de las células fúngicas estaban rotas, se recolectó el máximo de volumen celular posible y se agregó buffer de lisis, Proteinasa K (200µg/mL Invitrogen® Ref.25530-049) para completar la ruptura de la pared celular y se incubó a 65°C por 1 hora. Pasado éste tiempo se agregó fenol:cloroformo:isoamidoalcohol (25:24:1) (Sigma Ref.P2064) agitando firmemente hasta obtener una mezcla lechosa característica (Figura 12). Luego se centrifugó por 15 min a 14000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf.Centrifuge 5415) y se observaron las capas acuosa, intermedia y orgánica.



Figura 12: Extracción de ADN, se aprecia el precipitado color blanco al realizar extracción de ADN de las cepas de *Cryptococcus* y *Candida* evaluadas.

La fase acuosa fue transferida cuidadosamente a otro tubo (Eppendorf Microtube 3810X) y se le añadieron 10 µl de acetato de sodio 3M (Merck Ref.6268). Inmediatamente se agregó etanol frío 100% (Panreac Ref.212770). Al observar las trazas de precipitado, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm. Se decantó el etanol y se agregó etanol frío 70%, se centrifugó por 1 min más y dejando secar completamente el etanol al vacío (Millipore XX5522050). El sedimento correspondiente a ácidos nucleicos se resuspendió en 500 µL de agua bidestilada estéril.

Luego se realizó la comprobación del material extraído en una electroforésis (BioRad Mini Bus™ Cell) de agarosa (Invitrogen™ Ref.15510-019) al 0,8% (Figura 13) con bromuro de etidio (Invitrogen™ Ref.15585), observando el ADN aislado junto con restos de ARN. El patrón de pares de base utilizado fue *TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen™) desde 100 a 12000 bp.

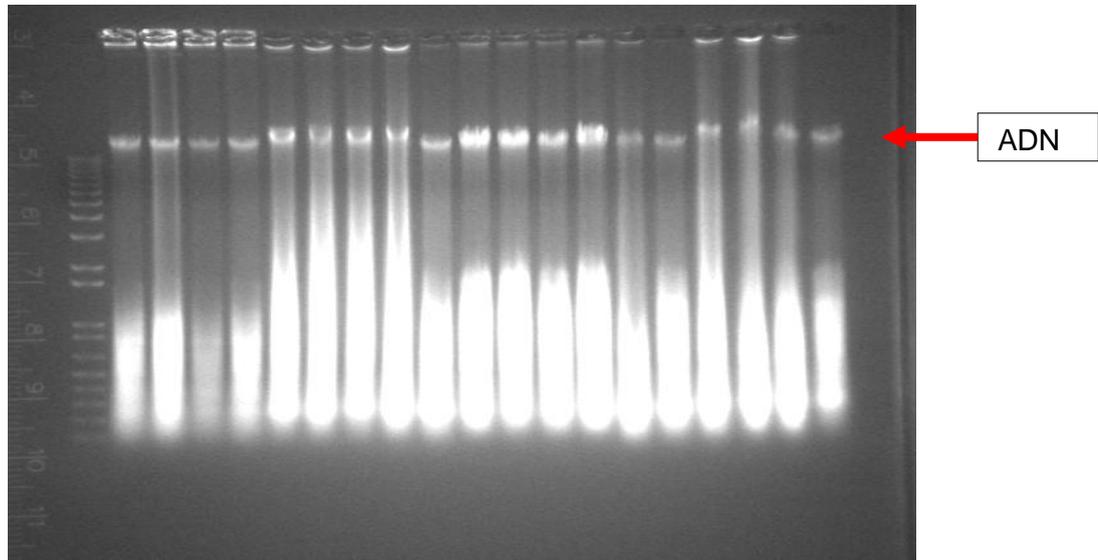


Figura 13: Electroforésis en gel de 0,8% agarosa. La flecha indica ADN, debajo se puede observar restos de ARN total.

Para purificar el ADN, 500 $\mu\text{g/mL}$ de RNasa (Invitrogen™ Ref.12091-021) fueron agregados, la mezcla se incubó por 1 hora a 37°C y una nueva electroforésis permitió observar el ADN puro y viable (Figura 14). Finalmente, el ADN resuspendido en agua bidestilada fue mantenido a -20°C hasta su utilización.

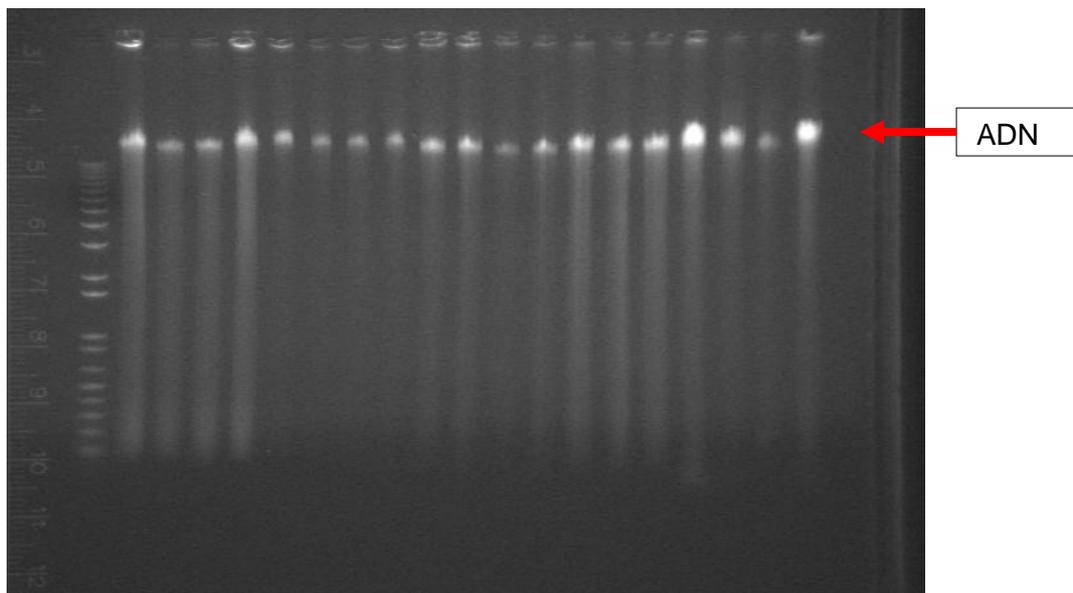


Figura 14: Electroforésis en gel de 0,8% agarosa. Se observa ADN purificado sin restos de ARN.

5.3.1.2.5 Amplificación del fragmento del gen CNLAC1. Realización de la PCR

El fragmento del gen de la lacasa fue amplificado a partir de ADN genómico utilizando las siguientes condiciones en un volumen final de reacción de 50µl.

Componente	Volumen (µl)	Concentración Final
H ₂ O bidestilada estéril.	30.5	-
(10x) Tampón TBE de PCR	5	1x
(10x) 25mM Cl ₂ Mg	3	2.5mM
(10x) solución dNTPs	4	200 µM
Primer Forward (100 pmol/µl)	1	1µM
Primer Reverse (100 pmol/µl)	1	1µM
Taq polimerasa 5 U/µl	0.5	-
DNA problema	5	-

Las condiciones utilizadas para el termociclador (*Master Cycler personal, Eppendorf*) fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial 94°C 5min		
30 ciclos	Desnaturalización	95°C 30seg
	Hibridación	50°C 1min
	Elongación	72°C 1min
	Elongación final	72°C 7min
Temperatura de mantenimiento después de la reacción: 4°C		

5.3.1.2.6 Secuenciación

El producto amplificado fue separado del resto del gel de agarosa y mediante una columna de purificación se preparó el material necesario para la secuenciación.

Las columnas CENTRI-SEP (Princeton Separation, Adelphia, NJ 07710) fueron usadas exactamente bajo las condiciones especificadas en las instrucciones del equipo. La secuenciación fue realizada en el *Servei de Genòmica de la Universitat Pompeu Fabra*, mediante el programa *ABI PRISM 310NT Genomic Analyser* (Applied Biosystems, Calif. USA) y el termociclador *BigDie Cycle-Sequencing kit*.

Posteriormente la secuencia de nucleótidos obtenida fue analizada utilizando nuevamente el programa informático *Basic Local Alignment Search Tool* (151).

5.3.1.2.7 RT-PCR. Extracción de ARN

Esta parte del estudio fue realizada en *Michigan State University, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Biomedical Laboratory Diagnostics* dirigido por Ph. D. Leonel Mendoza.

Se analizaron nueve cepas de *Cryptococcus gattii* (6 serotipo B y 3 serotipo C) para comprobar la transcripción del fragmento encontrado. Los aislados fueron cultivados en medio de cultivo Sabouraud líquido a 30°C por 72h, en agitación suave (Ika-Schüttler MTS 2). Posteriormente todo el cultivo fue recuperado en tubos *Falcon Blue Max* 50 mL y fue centrifugado a 6000 g x 10 min. El sedimento fue resuspendido en 1 mL de agua bidestilada al 0,1% de dietilpircarbonato (DEPC). Todo el material utilizado en este ensayo fue previamente lavado con 0,1% de DEPC, para evitar desnaturalización y contaminación del ARN.

Luego la masa de levaduras se colocó en contacto con perlas de vidrio estériles 0.40-0.60 mmø (Sartotins Ref.BBI-8541701), se colocó en hielo para mantener frío y se procedió a agitar con vortex hasta observar con azul de metileno que el 90% de las células fúngicas estuvieran rotas. Al líquido presente se le añadió 1 mL de *Tri-Reagent*® (*Molecular Research center, Inc. Cincinnati*. Cat.No.TR118) homogenizando bien la muestra y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C por 15 minutos (Eppendorf.Centrifuge 5415).

Después de la centrifugación, se observaron 3 capas, la inferior corresponde a la capa orgánica que contiene en su mayoría proteínas y fenol. La fase intermedia corresponde a ADN y la fase superior (acuosa) incolora a ARN total. A la fase superior, se le añadió 500 µl de Isopropanol (*Sigma-Aldrich* Prod.Nº 190764) por cada ml. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó la mezcla a 14.000 rpm a 4°C por 8 min. Se lavó el precipitado con etanol frío al 75% y se secó el ARN al vacío por 5 minutos. Fue resuspendido en agua de 0,1% DEPC, se realizó una electroforésis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Figura 15), el patrón de pares de base utilizado fue *TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen™) desde 100 a 12000 bp, finalmente la suspensión de ARN se mantuvo a -20°C hasta su uso.

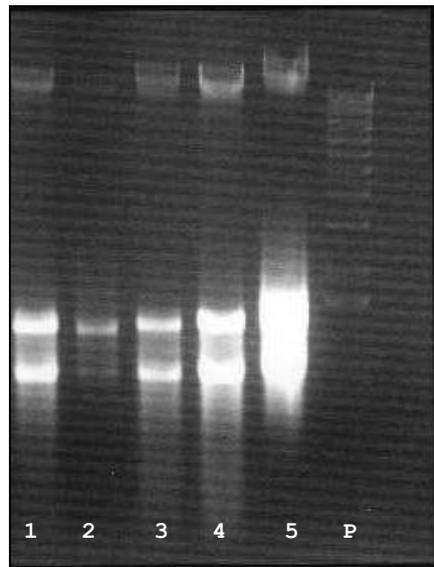


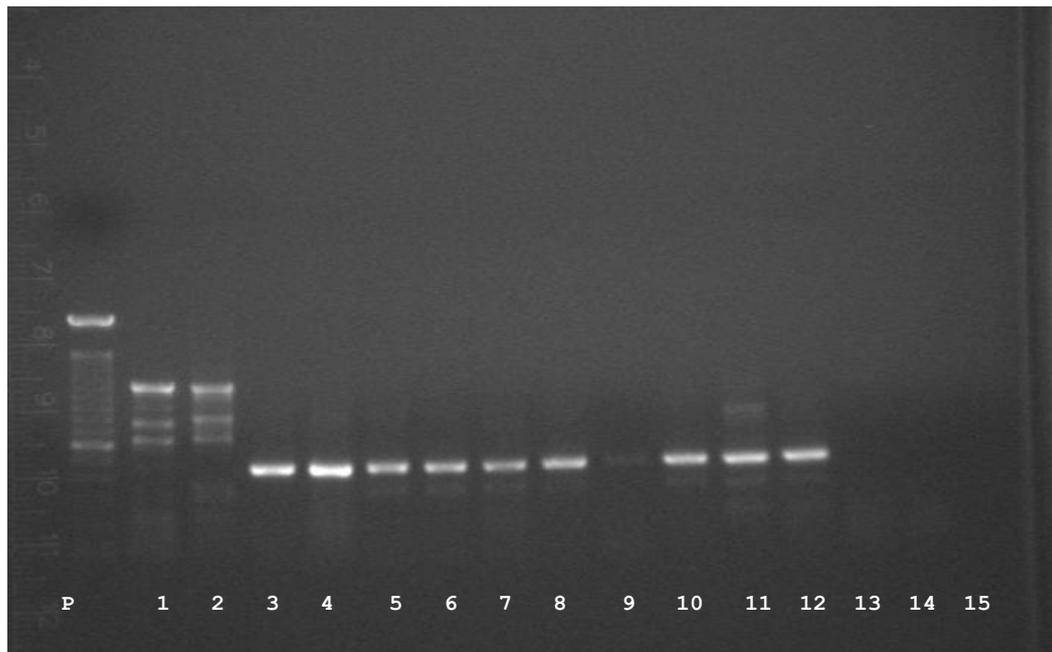
Figura 15: Electroforésis en gel de 1% agarosa. Extracción de ARN.
P: Patrón de pares de bases 1Kbplus DNA ladder, 1:B46; 2:B50; 3:TIMM1315; 4:C24; 5:*C.krusei*.

La concentración y pureza del ARN se comprobó mediante el espectrofotómetro. (GeneQuant-Pharmacia Biotech RNA/DNA Calculador). El kit utilizado para la realización de la RT-PCR fue *iScript™ cDNA Síntesis kit* (Bio-Rad), la concentración de cada muestra fue ajustada a $>1\mu\text{g/mL}$, concentración mínima necesaria recomendada para optimizar los resultados de la prueba. Posteriormente, la reacción de transcriptasa reversa fue realizada según las indicaciones del kit y el resultado se visualizó mediante electroforésis en el gel de agarosa a 1% con bromuro de etidio.

5.3.1.3 Resultados

5.3.1.3.1 Amplificación del fragmento del gen CNLAC1

El resultado de la amplificación se visualizó en una electroforésis en gel de agarosa a 0,8% (Figura 16) observando la presencia de una banda de aproximadamente 500 pb en todas las cepas de *Cryptococcus gattii*, serotipos B y C. La cepa TIMM 1315 *C. gattii* serotipo C, utilizada como control positivo también presentó el fragmento indicado, por el contrario la ATCC6258 *Candida krusei* fue negativa. El patrón de pares de bases utilizado fue *TrackIt™ 100bp DNA Ladder* (Invitrogen™).



**Figura 16: Electroforésis en gel de 0,8% agarosa. Resultado de la PCR, se observa el fragmento de aproximadamente 500 pb solo en las cepas de los serotipos B y C.
P: patrón de 100pb. 1-2: cepas de Serotipo A, 3-9 cepas de serotipo B, 10-12:serotipo C y 13-14:serotipo D. Control negativo 15:*Candida krusei*. Control positivo 12: TIMM1315.**

5.3.1.3.2 Análisis del fragmento del gen de la lacasa. Secuenciación

Una vez secuenciado, se observó que el fragmento del gen CNLAC1 amplificado tenía aproximadamente 440pb. La secuencia obtenida fue:

```
NNNNNTNNNNNTGTGNAGACCGATGGTACC GCCNTCTATGGGCCACTGTCCACGAAATGTCCATCGCACCTGGAGAA  
AGGTACTCTGCAATTATTAACACCTCTGAAGGAAAGGAAGGTGATGCATTTTGGCTGAGGACAAGTGTGCTCTGGGC  
TGTATGTTTGGTGGAGTACCTCAGGTGGGATTGGCGGTGGTGAGGTACACGGTAATGAAATGACTACTACTGCTGAG  
CCTCAGAGTTATGCTTGGTGAGTTATGGGGGAGCCTGGGGCTGAATTTTCAGCTGACAATATATCCAGGTCTGATCTAG  
CGAATGCTACCGCTCTCTGTGCTGGGCTCGACCAGACATATACTCTTTTCGTGAGCAGTGGTTGATTTCTTTGGTTTGA  
ACGTTTTCTAATAAATACTTAGACCACGAGAGAGAGNNNNNTTGTTCGTGTAN
```

Mediante el programa informático *BLAST* la secuencia del fragmento fue enfrentada con la base de datos de *GenBank*, y se obtuvo un 97% de homología con una secuencia parcial del gen CNLAC1 de *Cryptococcus bacillisporus*. (*GenBank* accession nº AB184041) (Figura 17).

Figura 17: Secuencia enfrentada en *GenBank*.

5.3.1.3.3 Transcripción del fragmento del gen de la lacasa. Prueba de RT-PCR

La concentración y pureza del ARN obtenido en las 9 cepas serotipos B y C, se observa en la Tabla 15. Posteriormente, se realizó la reacción de transcriptasa reversa y el resultado se visualizó mediante electroforesis en el gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Figura 18), observándose un fragmento de aprox 500 pb en las cepas de serotipos B y C probadas. Para demostrar la identidad del fragmento amplificado en esta segunda PCR posterior a la transcripción, fue nuevamente secuenciado y se comprobó que presentaba 97% de homología con *Cryptococcus bacillisporus*.

Nº	Cepa	Pureza	µg/mL	ratio
1	B46	59	2.7	1.194
2	B50	50	4.7	1.191
3	C24	56	2.4	1.138
4	TIMM1315	60	2.3	1.216
5	<i>C. krusei</i>	52	2.9	1.040

Tabla 15: Concentración de ARN obtenida para 2 *C. gattii* serotipo B, 2 serotipo C y *Candida krusei*.

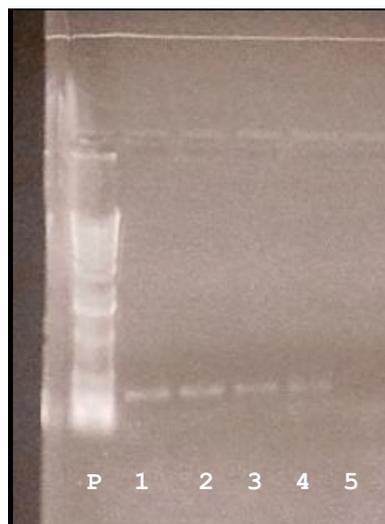


Figura 18: Resultado de la RT-PCR. Electroforesis en gel de 1% agarosa. 2 cepas de Serotipos B y 2 de serotipo C. P: Patrón de 1Kbplus DNA ladder (*Invitrogen™*), 1:B46; 2:B50; 3:C24; 4:TIMM1315; 5:*C.krusei*.

5.3.1.4 Discusión

Hasta la fecha, los genes que han despertado mayor interés para ser utilizados como modelos marcadores de la patogenicidad, son aquellos que se encuentran relacionados con los factores de virulencia de *Cryptococcus*, como por ejemplo la capacidad de producir melanina por la enzima lacasa. Los genes implicados en la síntesis de la enzima lacasa hasta ahora identificados como responsables han sido el gen CNLAC1 y posteriormente otros (152). Al gen CNLAC1 se le han identificado al menos, la presencia de 14 intrones (96) y de hecho, en toda la estructura del genoma de *Cryptococcus neoformans* se han identificado un gran número de intrones, aproximadamente 6500 (99).

Filogenéticamente, se ha estimado que ambas especies de *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans*, se separaron al evolucionar hace 16-160 millones de años (99), conservando factores de patogenicidad similares. Ambas especies sintetizan la enzima lacasa, ya que por pruebas estándares de laboratorio se evidencia la producción de melanina (81), a excepción de ciertos aislados clínicos descritos como deficientes en la producción de éste polímero (147).

Debido a que epidemiológicamente los casos clínicos difieren de acuerdo a la especie que produce la enfermedad, sin menospreciar el estado inmunológico del paciente, se puede suponer que los factores de patogenicidad no tienen el mismo papel en la virulencia. Utilizando un total de 55 cepas de *C. neoformans* y *C. gattii*, se evaluó las diferencias genómicas en una región del gen CNLAC1, encontrando que un fragmento de éste gen con aproximadamente 440 pb, solo se observó en el ADN genómico de *C. gattii* serotipo B y C sin importar el origen clínico o ambiental. Se observó también ausencia de este fragmento en todas las cepas evaluadas de *C. neoformans* serotipo A y D.

En los diferentes basidiomicetos productores de enzima fenoloxidasa, como *Bensingtonia*, *Bullera*, *Bulleromyces*, diferentes especies de *Filobasidiella* y otras especies de *Cryptococcus* (18), curiosamente, esta fragmento encontrado, no se corresponde con ninguna zona secuenciada hasta ahora en ninguno de éstos hongos, por lo tanto, se puede sugerir que éste fragmento es específico para *Cryptococcus gattii*.

Recientemente Leal *et al* (153), evaluaron la utilización de diversos iniciadores o primers específicos para la identificación de *C. neoformans* y *C. gattii*, diseñados a partir de secuencias ya existentes. Estos autores sugieren que la PCR múltiple es más específica que la prueba del medio de cultivo CGB. El fragmento del gen de la lacasa encontrado en el presente trabajo se observó en el 100% de los *C. gattii* serotipo B y C usados, por lo tanto, realizar una PCR con éstos iniciadores podría utilizarse para completar la identificación de las levaduras de *C. gattii*, sin poder distinguir el serotipo al cual pertenecen. Claro está que se necesitaría ampliar estos estudios, incluyendo en él, otras especies de *Cryptococcus*, para comprobar así la especificidad de los iniciadores.

Debido al número de intrones que presenta *Cryptococcus*, se comprobó *in vitro* que el fragmento obtenido, formaba parte del ADNc y que la proteína lacasa estaba siendo expresada con él, al menos en estas cepas específicamente, bajo las condiciones de éste estudio.

Sería de gran interés realizar otros ensayos al respecto, en donde sería posible clonar este fragmento, producir cepas mutantes y evaluar el poder patógeno *in vivo* de cepas de *Cryptococcus gattii* serotipo B y C, con y sin el fragmento presente. Actualmente, se realizan constantes esfuerzos para secuenciar el genoma de *Cryptococcus neoformans*, siendo esto de gran utilidad para la biología y patogenicidad de los basidiomicetos, los cuales pueden permitir el desarrollo de estrategias moleculares en modelos animales para identificar y caracterizar blancos potenciales para las drogas antifúngicas del futuro.

Objetivo 4

Artículo 4. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. J Antimicrob Chemother, 62(1):205-206.

MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*Josep M. Torres-Rodríguez^{1,2*}, Eidi Alvarado-Ramírez^{1,2}, Francisca Murciano¹ and Maite Sellart^{1,2}¹Infectious Disease and Mycology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, Dr Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain; ²UDIMAS, Autonomous University of Barcelona, Dr Aiguader 80, 08003 Barcelona, SpainKeywords: antifungals, triazoles, yeast, *in vitro* susceptibility

*Correspondence address. Infectious Disease and Mycology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, Dr Aiguader 88, Barcelona 08003, Spain. Tel: +34-933160400; Fax: +34-933160410; E-mail: jmtorres@imim.es

Sir,

The major aetiological species of cryptococcosis is *Cryptococcus neoformans*, which is distributed especially in association with pigeon droppings, and the most common infection is in the CNS of immunocompromised patients. *Cryptococcus gattii*, previously considered a biovariety of *C. neoformans*, is the second agent of cryptococcosis; four basic serotypes have been described: A and D for *C. neoformans* and B and C for *C. gattii*. Although its geographical distribution is restricted, *C. gattii* is being reported in new areas and has produced epidemic outbreaks in humans and animals.¹ Unlike *C. neoformans*, *C. gattii* can infect immunocompetent subjects.

The majority of the isolates from both species are susceptible to azoles *in vitro*,² although most reports do not discriminate between *Cryptococcus* species and serotypes. The main goal of this study was to determine the MICs and minimum fungicidal concentrations (MFCs) of the new antifungal drug posaconazole in comparison with those of voriconazole and fluconazole for *C. neoformans* and *C. gattii* isolates from various sources.

A total of 80 isolates of *Cryptococcus* from the collection of the Research Unit on Infectious Diseases and Mycology (Barcelona, Spain) were studied. Seventy-five were isolated from the CSF of patients infected with HIV, and five isolates were cultured from environmental samples. Fifty strains were *C. neoformans*: 25 serotype A (variety *grubii*) and 25 serotype D (variety *neoformans*). The remaining 30 isolates were *C. gattii* strains: 25 serotype B and 5 serotype C. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258 were used for quality control.

Posaconazole was provided by Schering-Plough (Kenilworth, NJ, USA), and voriconazole and fluconazole were provided by Pfizer Pharmaceuticals (Groton, CT, USA).

Stock solutions of azoles and microplates were prepared and processed, as described in CLSI (formerly NCCLS) document

M27-A2.³ Yeast inocula were diluted to a final concentration of $0.5\text{--}2.5 \times 10^3$ cfu/mL.

From optically clear wells, 10 μ L was withdrawn and plated on Sabouraud dextrose agar for the determination of MFC. Plates were incubated at 35°C for 72 h. MFC was defined as the lowest drug concentration that yielded less than three colonies, a killing activity of $\sim 99\%$.

For statistical analysis, the Wilcoxon rank-sum test was used using SPSS 14.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), with significance being set at $P < 0.05$.

Results of the study confirmed that MICs for the two quality control *Candida* isolates were within the limits described in the M27-A2 document.³ Table 1 shows MIC₅₀ and MFC₅₀ values, geometric means and ranges of the three azoles.

Statistical analysis revealed no significant differences between MICs of posaconazole and voriconazole. However, highly significant differences were found between fluconazole MICs and those of the other two azoles ($P < 0.001$). The MICs for the two *Cryptococcus* species were compared; they were found to be significantly higher for *C. gattii* than for *C. neoformans* ($P = 0.007$), especially the MICs of fluconazole. The MFCs of fluconazole and voriconazole were higher for *C. gattii* serotype B. In contrast, the MFCs of posaconazole were lower, only 2 mg/L for one *C. neoformans* serotype A isolate and one *C. gattii* serotype B isolate. The MFCs of voriconazole were higher: ≥ 1 mg/L for 4 *C. neoformans* isolates and ≥ 2 mg/L for 11 *C. gattii* serotype B isolates (44%). The highest MFCs were 2 mg/L for posaconazole, 4 mg/L for voriconazole and 16 mg/L for fluconazole.

Several cases of *C. neoformans* isolates exhibiting marked reduction in susceptibility to fluconazole have been reported in AIDS patients.⁴ Diverse authors attributed the increase in resistance to the widespread use of maintenance therapy with fluconazole. Other studies have reported the opposite trend. The antifungal susceptibility of 70 Spanish *C. neoformans* clinical isolates did not change significantly between 1994–96 and 1997–2005. The fluconazole MIC₅₀ values remained stable, and the authors concluded that the *in vitro* resistance to fluconazole decreased over the 11 years.⁵ Pfaller *et al.*² examined a large series of strains from 100 medical institutions and reported an accumulative percentage of 99% for isolates inhibited by voriconazole or posaconazole: 99% of the isolates being susceptible at MIC ≤ 1 mg/L. Although the authors did not discriminate between *C. neoformans* and *C. gattii*, presumably the majority of isolates were *C. neoformans*.

We have found a very low level of resistance of *Cryptococcus* species to azoles. The highest MICs were obtained for *C. gattii* serotype B; this species appeared to be less susceptible to the azoles than both serotypes (A and D) of *C. neoformans* ($P = 0.007$ for MIC and $P = 0.020$ for MFC). MFCs could be better predictors of clinical response to antifungal therapy; however, standard methods have not been developed. Most investigators follow the proposals of Espinel-Ingroff *et al.*⁶

Greater differences in MFCs than MICs were seen; 2 isolates of *C. gattii* had MFCs of fluconazole ≥ 16 mg/L and 13 isolates had MFCs of voriconazole ≥ 2 mg/L.

Research letter

Table 1. Susceptibilities (mg/L) of 80 *Cryptococcus* isolates belonging to four serotypes to fluconazole (FLC), voriconazole (VRC) and posaconazole (POS)

Antifungal agent	Serotype	MIC range	MFC range	MIC ₅₀	MFC ₅₀	GM MIC	GM MFC
FLC	A	<0.125–1.0	<0.125–2	0.5	0.5	0.4	0.5
	D	<0.125–1	<0.125–1	0.5	1.0	0.4	0.7
	B	0.25–2.0	0.25–16	1	2.0	1	1.8
	C	0.5–1.0	1–2	0.5	2.0	0.7	1.5
VRC	A	<0.03–0.25	<0.03–2	0.12	0.12	0.1	0.2
	D	0.06–0.25	0.06–>1	0.06	0.5	0.1	0.1
	B	0.12–0.5	0.12–4	0.25	1.0	0.2	1.0
	C	0.06–0.25	0.12–0.25	0.25	0.25	0.1	0.2
POS	A	<0.03–0.25	<0.03–2	0.12	0.25	0.1	0.1
	D	<0.03–0.25	<0.03–0.5	0.12	0.12	0.1	0.2
	B	0.06–0.5	0.06–2	0.12	0.25	0.2	0.3
	C	0.06–0.25	0.06–0.25	0.25	0.25	0.2	0.2

GM, geometric mean.

Isolates tested were 25 *C. neoformans* serotype A (variety *grubii*), 25 *C. neoformans* serotype D (variety *neoformans*), 25 *C. gattii* serotype B and 5 *C. gattii* serotype C.

The possibility of change for *in vitro* susceptibility of *Cryptococcus* spp. in the future justifies the need for further systematic studies using standardized techniques. This is particularly valid for azoles, as their period of clinical and therapeutic use is still very short.

Acknowledgements

We thank Schering-Plough Laboratories for supplying the antifungal posaconazole.

Funding

A part of this project was financed by 'Fondo de Investigaciones Científicas' (FIS) PI02/0413 and internal funds.

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 17258–63.
2. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L *et al.* Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990–2004). *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2163–7.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Second Edition: Approved Standard M27-A2*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
4. Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A *et al.* Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 1069–73.
5. Aller AI, Claro R, Castro C *et al.* Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in HIV-infected patients to fluconazole, itraconazole and voriconazole in Spain: 1994–1996 and 1997–2005. *Chemotherapy* 2007; **53**: 300–5.
6. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Meter J *et al.* Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations to new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp. NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3204–8.

5.4 Objetivo 4

Establecer patrones de sensibilidad de *C. neoformans* y *C. gattii* a los triazoles utilizados para el tratamiento de la criptococosis, así como, para el posaconazol, considerado una nueva alternativa terapéutica.

5.4.1 Artículo 4: MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother*, 62(1):205-206.

La criptococosis suele ser una enfermedad extremadamente grave y con mal pronóstico, sobre todo para sujetos inmunodeprimidos. Hasta ahora se conoce que la mayoría de los casos de criptococosis meníngea son producidas por una de las especies más patógenas del género *Cryptococcus*, *C. neoformans* y *C. gattii*, aunque se han descritos algunos cuadros de meningitis y criptococemia producidos por diferentes especies menos patógenas como *C. albidus* y *C. laurentii* (154).

La mayoría de los aislamientos de *C. gattii* y *C. neoformans* son sensibles *in vitro* a los antifúngicos azoles (155). Sin embargo, la sensibilidad de estas levaduras es variable y depende de la especie, el área geográfica y origen de las cepas. La gran mayoría de los trabajos realizados acerca de la sensibilidad de éstas levaduras, incluyendo las largas series de Pfaller *et al* (155), no discriminan entre las especies evaluadas y mucho menos entre los serotipos de cada una de ellas.

Los antifúngicos tradicionalmente utilizados para el tratamiento de la criptococosis son en primer lugar la anfotericina B (AB) desoxicolato o asociada a lípidos, administrada de forma exclusiva o bien en combinación con la 5-fluorocitocina (5FC). Este tratamiento es el de primera elección en enfermos de sida con meningitis por criptococos.

Como antifúngico alternativo en pacientes sin evidencias de inmunosupresión o inmunodeprimidos no-sida, también se utiliza el fluconazol por vía intravenosa, que posteriormente puede administrarse por v/o. El itraconazol (ITZ) también se ha utilizado como tratamiento alternativo y al igual que el fluconazol es empleado como terapia de mantenimiento para evitar recidivas (114).

Hasta ahora se han descrito pocos casos de resistencia a estos antifúngicos comúnmente utilizados. Quindos *et al* (140), comentan que la resistencia a voriconazol de *Cryptococcus neoformans* obtenidos de aislados clínicos españoles es poco frecuente y que presenta tendencia a disminuir, Morera *et al* (156), no encontraron aislados resistentes al voriconazol en 55 cepas de *C. gattii*.

Los primeros triazoles, fueron introducidos hace más de 15 años para el tratamiento sistémico de distintas micosis. Debido a la diferente actividad, y a los diversos efectos adversos e interacciones con otros fármacos que pueden presentar estos antifúngicos, constantemente se realizan estudios para ampliar el abanico de posibilidades y tener opción de poder administrar otros azoles más activos y menos tóxicos con mayor efectividad para el tratamiento de micosis profundas o sistémicas. Tal es el caso, del VNZ y POS, que recientemente han sido aprobados para su uso terapéutico (157).

En el 2007 se ha introducido el PZ, que actualmente se comercializa en España y que aporta mayor espectro de actividad, y una buena tolerancia en su administración oral (158). La información disponible sobre la sensibilidad de *Cryptococcus* a este antifúngico es muy limitada y hasta la publicación de nuestro trabajo, no existían datos referidos a la diferenciación por serotipos y muy pocos referidos a las dos especies patógenas de este género.

Los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos convencionales y a nuevos preparados (sordarina, albaconazol) de *Cryptococcus* diferenciando netamente las especies (o las variedades, antes del 2002), y los serotipos, así como el origen clínico o ambiental de los aislados, ha sido una constante del grupo de investigación en el que he desarrollado la tesis doctoral. En efecto, en 6 publicaciones anteriores (156,159-163), se profundiza en este tema demostrando que en algunos casos el grado de sensibilidad varía según el serotipo considerado. Por ejemplo, el serotipo B de *C. gattii* resultó significativamente menos sensible a un derivado de la sordarina que los serotipos A y AD de *C. neoformans* (160).

Otro de los objetivos del presente trabajo, ha sido determinar las concentraciones fungicidas mínimas (CFM) de los triazoles. Aunque este método todavía no está completamente estandarizado, se considera que puede aportar mayor información sobre la actividad antifúngica que la determinación tradicional de la CMI.

Por lo tanto, con el objetivo de ampliar la información disponible actual en cuanto a patrones de sensibilidad de *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans*, se determinó la actividad *in vitro* de tres azoles: fluconazol, posaconazol y voriconazol mediante la técnica de microdilución en medio líquido según la guía del CLSI M27-A2 (105). Los resultados de éste estudio se han publicado en *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(1):205-6 (164).

Se incluyeron un total de 80 aislados de *Cryptococcus*, 75 de origen clínico y 5 de origen ambiental. De éstos aislados, hubo 50 *C. neoformans* (25 serotipo A, 25 serotipo D) y 30 cepas *C. gattii* (25 serotipo B, 5 serotipo C) (Tabla 8).

Para controlar la calidad de las microplacas de antifúngicos preparadas en el laboratorio, así como del medio de cultivo RPMI+glucosa, y en general todas las condiciones de la prueba, se incluyeron las cepas de control de calidad recomendadas en las instrucciones del manual M27-A2 (105) que actualmente es sustituido por el manual M27-A3 (104) y cuyos valores esperados de CMI se muestran en la Tabla 16. Los valores obtenidos en este trabajo para las cepas de control de calidad, se encontraron dentro de los rangos establecidos.

Organismo	Antifúngico	Rango (µg/mL)	Valor obtenido (µg/mL)
<i>Candida parapsilopsis</i> ATCC® 22019	Fluconazol	0,5-4,0	0,5
	Voriconazol	0,016-0,12	0,12
	Posaconazol	0,06-0,25	0,06
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Fluconazol	8,0-64	16
	Voriconazol	0,06-0,5	0,5
	Posaconazol	0,06-0,5	0,06

Tabla 16. Límites recomendados para CMI (µg/mL) en 24 horas para las dos cepas de control de calidad utilizadas para microdilución en caldo. Tomado de Manual M27-A2 (105). ATCC® marca registrada de American Type Culture Collection.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se pueden obtener para un gran número de sustancias, como antibióticos, antineoplásicos y antifúngicos, entre otros. Representan las concentraciones más reducidas del medicamento que causan una inhibición determinada en el crecimiento de los microorganismos con interés clínico.

Generalmente, se emplea el criterio de una inhibición del 50% o 95% del crecimiento. En este trabajo se calculó la CIM del 50% de las cepas evaluadas; así como para la concentración fungicida mínima, CIM50 y CFM50 respectivamente (165).

No suele ser muy común la descripción de fallos terapéuticos debido a resistencia a los antifúngicos por parte de cepas de *Cryptococcus*, sin embargo, se realizan gran cantidad de trabajos para evaluar los patrones de sensibilidad de este hongo a los antifúngicos existentes (155). Como se ha comentado, la mayoría de estas investigaciones, no discriminan en especies ni en serotipos, y debido a la diversidad epidemiológica que presentan ambas especies, consideramos importante evaluar la sensibilidad de la forma más específica y discriminativa a los antifúngicos comúnmente utilizados o que se pueden utilizar en el tratamiento de la criptococosis.

Para leer los resultados de las CMI obtenidas para los azoles, se siguió el criterio de interpretación recomendado en el manual M27-A2, que acepta que la CMI corresponde al pocillo de disminución del crecimiento visible (aprox. 50%), en relación con el pocillo control de crecimiento, libre de droga.

Si utilizamos los criterios para clasificar con una finalidad práctica las cepas de *Cryptococcus* en sensibles (S), sensible dependiente de la dosis (SDD) o resistentes (R) al fluconazol (105), tenemos que: $S \leq 8 \mu\text{g/mL}$, SDD 16-32 $\mu\text{g/mL}$ y $R \geq 64 \mu\text{g/mL}$. Actualmente no existen criterios aprobados para voriconazol o posaconazol. Sin embargo, Pfaller *et al* (109), propuso puntos de corte en especies de *Candida*, que clasifican la actividad antifúngica del voriconazol en $S \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ y $R \geq 4 \mu\text{g/mL}$.

En base a estos criterios, se puede observar en la Tabla 17, ninguno de los valores de rango de CMI obtenidos para el fluconazol, posaconazol y voriconazol fueron $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, con lo cual todas las cepas se pueden considerar S para los tres antifúngicos evaluados.

Antifúngico	Serotipo	Rango CMI	Rango CFM	CMI 50	CFM 50	MG CMI	MG CFM
Fluconazol	A	<0,125-1,0	<0,125-2	0,5	0,5	0,4	0,5
	D	<0,125-1	<0,125-1	0,5	1,0	0,4	0,7
	B	0,25-2,0	0,25-16	1	2,0	1	1,8
	C	0,5-1,0	1-2	0,5	2,0	0,7	1,5
Voriconazol	A	<0,03-0,25	<0.03-2	0,12	0,12	0,1	0,2
	D	0,06-0,25	0,06->1	0,06	0,5	0,1	0,1
	B	0,12-0,5	0,12-4	0,25	1,0	0,2	1,0
	C	0,06-0,25	0,12-0,25	0,25	0,25	0,1	0,2
Posaconazol	A	<0,03-0,25	<0,03-2	0,12	0,25	0,1	0,1
	D	<0,03-0,25	<0,03-0,5	0,12	0,12	0,1	0,2
	B	0,06-0,5	0,06-2	0,12	0,25	0,2	0,3
	C	0,06-0,25	0,06-0,25	0,25	0,25	0,2	0,2

Tabla 17. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Fungicida Mínima ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de 80 cepas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* de fluconazol, voriconazol y posaconazol.

El posaconazol es el antifúngico azólico mas nuevo que se encuentra comercializado, su formula química es mas cercana al itraconazol que al fluconazol (127). Aplicando los mismos criterios descritos para el voriconazol, se comprobó que ninguna de las cepas presentó resistencia, ya que el valor del rango de CMI más alto obtenido, nunca fue $\geq 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 17).

Las concentraciones fungicidas mínimas (CFM) para los tres antifúngicos, también fueron evaluadas. Actualmente, no existen criterios para una interpretación equivalente a los términos de sensibilidad o resistencia, y tampoco existen unas pautas estandarizadas para su realización. Muchos investigadores, utilizan los criterios empleados por Espinel-Ingroff (166).

Diversos autores han demostrado que las CFM pueden predecir mejor que las CIM las posibilidades de fallo terapéutico, esto ha sido estudiado en *Trichosporonosis* y en candidemias, al menos en modelos animales (167-169). Indicando que valores elevados de CFM, pueden predecir el desarrollo de resistencia por parte de los aislados en algunos casos.

En base a estos datos, es interesante comentar que en las cepas evaluadas en este trabajo solo 2 de 30 aislamientos de *C. gattii* (B48a y B331c) (Tabla 18) presentaron valores de $16 \mu\text{g}/\text{mL}$ de CFM para fluconazol, indicando, por lo tanto, una baja predicción de éxito terapéutico en general.

La posibilidad de que ocurra un cambio en la sensibilidad de *Cryptococcus* spp en el futuro, justifica la necesidad de estudios *in vitro* e *in vivo*, utilizando pruebas estandarizadas, que validen la actividad de los azoles así como de otros antifúngicos accesibles comercialmente.

CEPA	FNZ CMI	FNZ CMF	VNZ CMI	VNZ CMF	POS CMI	POS CMF
A95a	0,5	0,5	0,12	0,12	0,25	0,25
A97a	0,5	0,5	0,12	0,12	0,12	0,12
A118a	1	1	0,12	0,25	0,25	0,25
A119a	<0,125	0,25	0,06	0,5	0,06	0,06
A148a	0,5	1	0,12	0,12	0,25	0,25
A17c	<0,125	<0,125	<0,03	0,12	<0,03	<0,03
A19c	<0,125	0,25	0,06	0,25	0,06	0,06
A148c	<0,125	<0,125	0,06	0,06	0,06	0,06
A469c	0,25	0,5	0,12	0,12	0,12	0,12
A473c	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25
A101c	0,25	1	0,06	0,12	0,06	0,12
A102c	1	1	0,12	0,12	0,12	0,12
A108c	0,25	0,25	0,06	0,06	0,12	0,12
A109c	0,5	1	0,12	0,25	0,25	0,25
A112c	0,25	0,5	0,12	0,12	0,25	0,12
A302c	<0,125	<0,125	<0,03	<0,03	0,06	0,06
A304c	0,5	0,5	0,12	0,12	0,06	0,06
A306c	0,5	0,5	0,25	1	0,12	0,12
A307c	0,5	0,5	0,25	2	0,25	0,25
A312c	0,5	0,5	0,25	2	0,25	0,12
A332c	0,25	0,5	0,06	0,5	0,12	0,12
A333c	1	1	0,25	0,25	0,12	0,12
A334c	1	2	0,25	0,25	0,25	2
A335c	0,5	1	0,12	0,12	0,12	0,25
A339c	1	2	0,25	0,25	0,25	0,25
B169c*	0,5	0,5	0,25	0,25	0,12	0,12
B48a*	1	16	0,25	2	0,12	0,12
B50a*	2	2	0,5	4	0,25	0,5
B52a*	1	4	0,25	0,5	0,12	0,12
B53a*	0,5	2	0,25	2	0,12	0,25
B56a*	0,5	4	0,12	2	0,25	0,5
B58a*	1	4	0,5	4	0,25	0,5
B59a*	1	2	0,5	4	0,25	1
B60a*	2	1	0,5	4	0,25	1
B470c*	1	2	0,5	4	0,25	0,5
B163c*	2	2	0,5	4	0,25	2
B170c*	2	2	0,25	0,5	0,12	0,12
B171c*	0,5	0,5	0,12	0,12	0,12	0,12
B172c*	1	1	0,12	0,25	0,12	0,12
B173c*	1	4	0,12	1	0,12	0,25
B174c*	2	4	0,5	1	0,25	0,25
B331c*	2	16	0,12	1	0,12	0,25
B168c*	0,5	0,5	0,12	0,12	0,12	0,12
B175c*	2	4	0,5	4	0,12	0,5
B257c*	1	1	0,12	0,12	0,12	0,12
B258c*	0,5	0,5	0,12	0,12	0,12	0,12

CEPA	FNZ		VNZ		POS	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
B416c*	2	4	0,5	0,5	0,5	0,5
B260c*	0,25	0,25	0,12	0,06	0,06	0,06
B259c*	1	2	0,5	4	0,06	0,06
B261c*	0,5	0,5	0,12	1	0,12	1
BV19*	0,5	2	0,25	0,25	0,25	0,25
H0058*	0,5	2	0,12	0,25	0,25	0,25
C24a*	1	2	0,12	0,12	0,25	0,25
TIMM1315*	0,5	1	0,06	0,25	0,06	0,06
IFM5875*	0,5	1	0,12	0,12	0,12	0,12
D1c	1	1	0,12	0,12	0,25	0,5
D2c	1	1	0,25	0,25	0,25	0,5
D3c	1	1	0,12	0,12	0,12	0,25
D6c	0,5	0,5	0,12	0,25	0,12	0,25
D13c	0,25	0,5	0,12	0,12	0,12	0,25
D32c	<0,125	0,125	0,06	0,06	<0,03	0,03
D94c	0,5	1	0,12	0,25	0,12	0,12
D97c	0,5	1	0,06	0,06	<0,03	0,12
D125c	0,5	0,5	0,06	0,12	0,06	0,06
D213c	0,25	0,5	0,06	0,12	0,06	0,12
D399c	<0,125	<0,125	0,06	0,12	<0,03	0,03
D21c	0,5	1	0,06	0,06	0,06	0,12
D35c	1	1	0,06	0,12	0,06	0,12
D38c	1	2	0,06	0,25	0,12	0,25
D188c	<0,125	0,25	0,06	0,12	<0,03	0,25
D145c	1	1	0,12	1	0,06	0,06
D192c	0,5	0,5	0,12	0,25	0,12	0,25
D183c	1	1	0,12	0,5	0,25	0,25
D191c	0,25	1	0,12	0,5	0,12	0,25
D311c	<0,125	<0,125	0,06	0,12	<0,03	0,03
D182c	<0,125	<0,125	0,06	0,06	<0,03	0,03
D187c	1	1	0,12	0,12	0,06	0,12
D309c	0,125	0,25	0,12	0,25	0,12	0,12
D181c	0,125	0,25	0,06	0,25	0,12	0,5
D179c	0,25	1	0,25	0,25	0,12	0,12

Tabla 18. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración fungicida mínima (CMF) en µg/mL de Fluconazol (FNZ), Voriconazol (VNZ) y Posaconazol (POS) de *Cryptococcus gattii** (N=30) y *C. neoformans* (N=50).

5.4.2 Alternativas al método de referencia M27-A2

Debido a las dificultades que tienen muchos laboratorios clínicos para determinar las CMI utilizando los métodos de microdilución en placa estandarizados, como es el caso del método de referencia del CLSI M27-A2 y su nueva versión M27-A3 (104), consideramos indicado comparar la sensibilidad de *C. neoformans* y *C. gattii* al nuevo antifúngico posaconazol, empleando una técnica comercial como las tiras de Etest®,

ampliamente usada por la mayoría de los laboratorios de microbiología, por considerarse una técnica práctica, sencilla y rápida de realizar.

Para ello se procedió a analizar la concordancia del Etest® con el método de referencia M27-A2 utilizando los mismos aislados de *Cryptococcus* que en la publicación anterior, y tiras de Etest® de Posaconazol (AB BIODISK, Solna, Sweden).

Este estudio, todavía sin publicar, que constituye una aportación al estudio de sensibilidad a este triazol, fue presentado en formato *poster* (P010) en el *3rd Trends in Medical Mycology*. Torino 28-31 octubre 2007 (Anexo).

El sistema Etest® comercializado por AB BIODISK, Solna, Sweden. Esta técnica cuantitativa de difusión en agar esta basada en tiras impregnadas con antifúngico, en un gradiente variable de concentración. Su correlación con el método del CLSI varía según los estudios realizados y depende de varios factores como son: los medios de cultivo, tiempo de incubación y sobre todo la interpretación de la lectura del elipse de inhibición. Esta es una técnica fácil y rápida de hacer en un laboratorio de microbiología asistencial. Su principal desventaja para algunas regiones geográficas es su disponibilidad comercial y precio de venta.

La técnica estandarizada mas frecuentemente utilizada como método de referencia corresponde al de microdilución en caldo. Como se ha comentado, existen varias guías editadas por el CLSI, en donde se dictan las pautas para realizar este método, la más recientemente publicada es la guía M27-A3 (101) precedida anteriormente por la M27-A2 (102). La mayor desventaja que presenta el método de microdilución en caldo, es que se trata de un método muy laborioso que no es práctico para incorporar en un laboratorio de asistencia médica.

Por lo tanto, ya que las tiras de Etest® del antifúngico posaconazol se encuentran disponibles comercialmente, es interesante conocer el comportamiento que pueda tener este antifúngico frente a aislados de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*.

Utilizando las mismas 80 cepas (*C. neoformans* N=50 y *C.gattii* N=30), descritas en el apartado anterior, se procedió a determinar la susceptibilidad al posaconazol, mediante la técnica M27-A2 y el método de Etest® en medio agar-RPMI. Para el método evaluado se siguieron los procedimientos indicados en la guía publicada por la empresa distribuidora de las tiras de antifúngicos (AB BIODISK, Solna, Sweden).

También fueron utilizadas las cepas de control de calidad *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258, obteniéndose los valores esperados de CMI para el Etest® que resultaron de 0,032 µg/mL y 1,0 µg/mL; respectivamente.

Los resultados de este estudio demostraron un 100% de concordancia (Tabla 19) entre el método de referencia M27-A2 y las tiras de Etest®, aunque se apreció una sensibilidad ligeramente mayor para el método de referencia (Tabla 19). El Etest® presentó valores de una dilución inferior al M27-A2, sin que se detectara ningún aislado resistente al posaconazol.

Basándonos en estos datos es posible sugerir que el Etest® es un método comercialmente disponible, que en las condiciones de aplicación también es útil para determinar las CMI al posaconazol, tanto en *C. neoformans* como en *C. gattii*.

Técnica	Rango	CMI 50%	CMI 90%	MG	%Concordancia
M27-A2 (POS)	<0,03-0,5	0,12	0,25	0,1	-
Etest® agar RPMI (POS)	0,032-0,5	0,25	0,5	0,2	100

Tabla 19. Rango de Concentración mínima inhibitoria (CMI) al posaconazol (µg/mL), CMI 50% y 90%, media geométrica (MG) y porcentaje de concordancia entre el método de referencia (M27-A2) y Etest. 80 cepas evaluadas, *Cryptococcus neoformans* (N=50) y *C. gattii* (N=30).



Conclusiones



6 Conclusiones

De acuerdo con los objetivos que nos propusimos en el capítulo correspondiente se ha podido llegar a las siguientes conclusiones:

Conclusiones referidas al Objetivo 1:

- 1.1 Para poder estudiar las diferencias en la actividad ureasa de ambas especies, *C. neoformans* y *C. gattii*, se diseñó un método original y reproducible que permitió realizar la cuantificación de esa actividad enzimática.
- 1.2 Utilizando ese método *in vitro*, se comprobó que los aislados de *Cryptococcus neoformans* presentaban (estadísticamente) mayor actividad ureasa que las de *C. gattii*, independientemente del origen de las cepas.

Conclusiones referidas al Objetivo 2:

- 2.1 Realizando una adaptación de la técnica utilizada para medir la actividad fenoloxidasa de *Mycobacterium leprae*, fue posible analizar cuantitativamente la producción de esta enzima a partir de cultivos puros de *C. gattii* aislados de cabras, comparándolos con cepas de referencia de la misma especie y de *C. neoformans*.
- 2.2 Los resultados obtenidos demostraron que, en conjunto, *C. gattii* presentaba *in vitro* mayor actividad lacasa (fenoloxidasa) que *C. neoformans*.
- 2.3 Las tres cepas con mayor producción de lacasa fueron los agentes de otros tantos brotes epidémicos de criptococosis en cabras, sugiriendo que esta enzima tiene un papel destacado en la virulencia de *C. gattii*.

Conclusiones referidas al Objetivo 3:

- 3.1 El estudio molecular de cepas seleccionadas de *C. gattii* demostró que el gen CNLAC1 de esta especie, presenta una región exclusiva en sus dos serotipos B y C.

3.2 Se pudo demostrar *in vitro* que la región identificada en el gen CNLAC 1, es utilizada en la transcripción de la expresión de la enzima lacasa, específicamente en *C. gattii* serotipos B y C.

Conclusiones referidas al Objetivo 4:

4.1 Utilizando un método de microdilución estandarizado de referencia, las 80 cepas de *C. neoformans* y de *C. gattii*, evaluadas resultaron sensibles a los tres antifúngicos estudiados, fluconazol, voriconazol y posaconazol. Las CMI de los dos últimos triazoles fueron muy similares, no superando los 0,5 µg/mL.

4.2 Se analizó la concentración mínima fungicida de estas cepas a los tres triazoles, comprobándose que resultados equivalentes a los de las CMI. A pesar de que el posaconazol presentó mayor actividad que los otros azoles, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos entre las dos especies de *Cryptococcus*, ni entre sus serotipos.

4.3 Se evaluó la utilidad del método Etest como alternativa al micrométodo, para determinar las CMI del posaconazol en *C. gattii* y *C. neoformans*, encontrándose un buen nivel de concordancia entre ambos métodos.

4.4 La elevada sensibilidad de ambas especies de *Cryptococcus* al posaconazol, sugieren que este nuevo antifúngico puede ser una alternativa terapéutica en el tratamiento de la criptococosis.



Referencias



7 Referencias

- (1) Rippon JW. Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. Third ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1988.
- (2) Benham RW. Cryptococci: Their identification by morphology and serology. J Infect Dis 1935;57:255-274.
- (3) Evans EE. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. J Immunol 1950;64:423-430.
- (4) Wilson DE, Bennett JE, Bailey JW. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Proc Soc Exp Biol Med 1968;127:820-823.
- (5) Emmons CW. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J Bacteriol 1951;62:685-690.
- (6) Gatti F, Eeckels R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. I. Description of the disease and of the strain. Ann Soc Belg Med Trop 1970;50:689-693.
- (7) Vanbreuseghem R, Takashio M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. Ann Soc Belg Med Trop 1970;50:695-702.
- (8) Kwon-Chung KJ. A new genus, *filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 1975;67:1197-1200.
- (9) Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Popkin TJ. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. J Bacteriol 1982;150:1414-1421.
- (10) Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol 1984;120:123-130.
- (11) Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennett JE. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1987;55:1751-1754.
- (12) Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol 1990;28:1642-1644.
- (13) Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell J, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae). Taxon 2002;51:804-806.
- (14) Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia 1976;68:943-946.
- (15) Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Theodore TS. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. Int J Syst Bacteriol 1978;28:616-620.
- (16) Aulakh HS, Straus SE, Kwon-Chung KJ. Genetic relatedness of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) and *Filobasidiella bacillispora* (*Cryptococcus*

bacillispora) as determined by DNA base composition and sequence homology studies. Int J Syst Bacteriol 1981;31:97–103.

(17) Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 2001;147:891-907.

(18) Gueho E, Improvisi L, Christen R, de Hoog GS. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 1993;63:175-189.

(19) Franzot SP, Fries BC, Cleare W, Casadevall A. Genetic relationship between *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* strains of serotypes A and D. J Clin Microbiol 1998;36:2200-2204.

(20) Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol 1999;37:838-840.

(21) Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, Fell JW. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. Syst Appl Microbiol 2000;23:535-545.

(22) Fan M, Chen LC, Ragan MA, Gutell RR, Warner JR, Currie BP, et al. The 5S rRNA and the rRNA intergenic spacer of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. J Med Vet Mycol 1995;33:215-221.

(23) Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Int J Syst Evol Microbiol 2000;50:1351-1371.

(24) Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Mol Ecol 2000;9:1471-1481.

(25) Petter R, Kang BS, Boekhout T, Davis BJ, Kwon-Chung KJ. A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. Microbiology 2001;147:2029-2036.

(26) Xu J, Luo G, Vilgalys RJ, Brandt ME, Mitchell TG. Multiple origins of hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. Microbiology 2002;148:203-212.

(27) Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. Br Med Bull 2004;72:99-118.

(28) Burnik C, Altintas ND, Ozkaya G, Serter T, Selcuk ZT, Firat P, et al. Acute respiratory distress syndrome due to *Cryptococcus albidus* pneumonia: case report and review of the literature. Med Mycol 2007;45:469-473.

(29) Kano R, Kitagawa M, Oota S, Oosumi T, Murakami Y, Tokuriki M, et al. First case of feline systemic *Cryptococcus albidus* infection. Med Mycol 2007;19:1-3.

(30) de Castro LE, Sarraf OA, Lally JM, Sandoval HP, Solomon KD, Vroman DT. *Cryptococcus albidus* keratitis after corneal transplantation. Cornea 2005;24:882-883.

- (31) Labrecque O, Sylvestre D, Messier S. Systemic *Cryptococcus albidus* infection in a Doberman Pinscher. *J Vet Diagn Invest* 2005;17:598-600.
- (32) Lin SR, Peng CF, Yang SA, Yu HS. Isolation of *Cryptococcus albidus* var. *albidus* in patient with pemphigus foliaceus. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* 1989;5:126-128.
- (33) Manfredi R, Fulgaro C, Sabbatani S, Legnani G, Fasulo G. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. *AIDS Patient Care STDS* 2006;20:227-232.
- (34) Shankar EM, Kumarasamy N, Bella D, Renuka S, Kownhar H, Suniti S, et al. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. *Can Respir J* 2006;13:275-278.
- (35) Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Kiratisin P, Mundy LM, Bailey TC. Evaluation of *Cryptococcus laurentii* meningitis in a patient with HIV infection: a case report and review of the literature. *Hawaii Med J* 2006;65:260-263.
- (36) Vlchkova-Lashkoska M, Kamberova S, Starova A, Goleva-Mishevskva L, Tsatsa-Biljanovska N, Janevska V, et al. Cutaneous *Cryptococcus Laurentii* infection in a human immunodeficiency virus-negative subject. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:99-100.
- (37) Krcmery V, Jr, Kunova A, Mardiak J. Nosocomial *Cryptococcus laurentii* fungemia in a bone marrow transplant patient after prophylaxis with ketoconazole successfully treated with oral fluconazole. *Infection* 1997;25:130.
- (38) Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC: ASM Press; 1998.
- (39) Steenbergen JN, Casadevall A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) isolates in New York City. *J Clin Microbiol* 2000;38:1974-1976.
- (40) Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 2001;39:155-168.
- (41) Baro T, Torres-Rodriguez JM, De Mendoza MH, Morera Y, Alia C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J Clin Microbiol* 1998;36:458-461.
- (42) Colom MF, Frases S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, et al. First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol* 2005;43:3548-3550.
- (43) Upton A, Fraser JA, Kidd SE, Bretz C, Bartlett KH, Heitman J, et al. First contemporary case of human infection with *Cryptococcus gattii* in Puget Sound: evidence for spread of the Vancouver Island outbreak. *J Clin Microbiol* 2007;45:3086-3088.
- (44) Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004;101:17258-17263.

- (45) Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Clin Infect Dis 1995;21:28-34; discussion 35-6.
- (46) Alonso M, Garcia F, Mallolas J, Soriano A, Ortega M, Miro JM, et al. Disseminated cryptococcosis in patients with AIDS. Prognostic factors of poor outcome. Med Clin (Barc) 1999;112:401-405.
- (47) Viciano P, Miralles-Martin P, Knobel H, Gatell JM. Prevention of opportunistic infections in the protease inhibitor era. Enferm Infec Microbiol Clin 1998;16:1-10.
- (48) McDonnell JM, Hutchins GM. Pulmonary cryptococcosis. Hum Pathol 1985;16:121-128.
- (49) Campbell GD. Primary pulmonary cryptococcosis. Am Rev Respir Dis 1966;94:236-247.
- (50) Cameron ML, Barlett JA, Gallis HA, Waskin HA. Manifestations of pulmonary cryptococcosis in patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome. Rev Infect Dis 1991;13:64-67.
- (51) Fisher BD, Armstrong D. Cryptococcal interstitial pneumonia: value of antigen determination. N Engl J Med 1977;297:1440-1441.
- (52) Lehmann PF, Morgan RJ, Freimer EH. Infection with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* leading to a pulmonary cryptococoma and meningitis. J Infect 1984;9:301-306.
- (53) Lozano F, Gomez-Mateos J, Irlas JA, Melendez B, Martin E. Fulminant septic shock in AIDS patients caused by disseminated cryptococcosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:151-152.
- (54) Perfect JR, Durack DT, Gallis HA. Cryptococemia. Medicine (Baltimore) 1983;62:98-109.
- (55) Larsen RA, Bozzette S, McCutchan JA, Chiu J, Leal MA, Richman DD. Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful treatment of meningitis. California Collaborative Treatment Group. Ann Intern Med 1989;111:125-128.
- (56) Chaskes S, Tyndall RL. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-Diphenols: effect of the nitrogen source. J Clin Microbiol 1975;1:509-514.
- (57) Kozel TR. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol. 1995;3:295-299.
- (58) Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol 1982;150:1212-1220.
- (59) Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. Appl Environ Microbiol 1994;60:3864-3866.
- (60) Wang Y, Casadevall A. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:2648-2650.

- (61) Viriyavejakul P, Tangwanicharoen T, Punpoowong B, Chaisri U, Wilainam P, Nuntakomon D, et al. Cryptococcal meningitis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004;35:33-38.
- (62) Javaloyas M, Alemany M, Isern I, Bastida MT. *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. *Med Clin (Barc)* 2007;129:80.
- (63) Sivasangeetha K, Harish BN, Sujatha S, Parija SC, Dutta TK. Cryptococcal meningoencephalitis diagnosed by blood culture. *Indian J Med Microbiol* 2007;25:282-284.
- (64) Diaz-Perez JA, Garcia-Vera JA, Mantilla-Hernandez JC, Pradilla-Ardila G. Cryptococcoma in the central nervous system of a non-immunocompromised patient. *Rev Neurol* 2008;46:97-101.
- (65) Johnson FY, Naraqji S. Manic episode secondary to cryptococcal meningitis in a previously healthy adult. *P.N.G. Med J*;36:59-62.
- (66) Panther LA, Sande MA. Cryptococcal meningitis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Semin Respir Infect* 1990;5:138-145.
- (67) Khyriem AB, Sujatha S, Das AK, Parija SC. Comparison of latex agglutination and co-agglutination for the diagnosis and prognosis of cryptococcal meningitis. *Indian J Med Microbiol* 2003;21:252-256.
- (68) Vasanthi S, Padmavathy BK, Gopal R, Sundaram RS, Manoharan G. Cutaneous cryptococcosis among HIV infected patients. *Indian J Med Microbiol* 2002;20:165-166.
- (69) Joshi S, Wattal C, Duggal L. Cutaneous cryptococcosis. *J Phycns India* 2004;52:242-243.
- (70) Dinato SL, Dinato MM, Nakanishi CP, Almeida JR, Romiti N. Disseminated cutaneous cryptococcosis in a patient with AIDS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:353-358.
- (71) Vogelaers D, Petrovic M, Deroo M, Verplancke P, Claessens Y, Naeyaert JM, et al. A case of primary cutaneous cryptococcosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:150-152.
- (72) Al-Tawfiq JA, Ghandour J. *Cryptococcus neoformans* abscess and osteomyelitis in an immunocompetent patient with tuberculous lymphadenitis. *Infection* 2007;35:377-382.
- (73) Souza MB, Melo CS, Silva CS, Santo RM, Matayoshi S. Palpebral cryptococcosis: case report. *Arq Bras Oftalmol* 2006;69:265-267.
- (74) Kiertiburanakul S, Sungkanuparph S, Buabut B, Prachartam R. Cryptococcuria as a manifestation of disseminated cryptococcosis and isolated urinary tract infection. *Jpn J Infect Dis* 2004;57:203-205.
- (75) Traboulsi R, Kanafani ZA, Kanj SS. Fungal infections of the genitourinary tract. *J Med Liban* 2004;52:202-209.
- (76) Vawda F, Maharajh J, Naidoo K. Massive cryptococcal lymphadenopathy in an immunocompetent pregnant patient. *Br J Radiol* 2008;81:e53-6.

- (77) Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res 2006;6:574-587.
- (78) Vance AM. The use of the mucicarmine stain for a rapid presumptive identification of *Cryptococcus* from culture. Am J Med Technol 1961;27:125-128.
- (79) Baro T, Torres-Rodriguez JM, Morera Y, Alia C, Lopez O, Mendez R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. J Clin Microbiol 1999;37:1170-1172.
- (80) Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). J Clin Microbiol. 1982;15:535-537.
- (81) Min KH, Kwon-Chung KJ. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 1986;261:471-480.
- (82) Dufait R, Velho R, De Vroey C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. Mykosen 1987;30:483.
- (83) Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S, Vidotto V. Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. Mycoses 2007;50:277-281.
- (84) Chen LC, Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. Clin Diagn Lab Immunol 1996;3:570-574.
- (85) Vidotto V, Leone R, Sinicco A, Ito-kuwa S, Criseo G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. Mycopathologia 1998;142:71-76.
- (86) Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. Med.Mycol. 1999;37:175-181.
- (87) Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. Mol Cell Biol 1994;14:4912-4919.
- (88) Borelli D. Medios caseros para Micología. Arch Venez Med Trop Para Med 1969;4:301-310.
- (89) Eisenman HC, Casadevall A, McClelland EE. New Insights on the Pathogenesis of Invasive *Cryptococcus neoformans* Infection. Curr Infect Dis Rep 2007;9:457-464.
- (90) Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. Am J Pathol 2004;164:1761-1771.
- (91) Bava AJ, Negroni R, Bianchi M. Cryptococcosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. J Med Vet Mycol 1993;31:87-89.
- (92) Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. Clin Microbiol Rev 1996;9:469-488.

- (93) Zhu X, Gibbons J, Garcia-Rivera J, Casadevall A, Williamson PR. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect.Immun.* 2001 Sep;69(9):5589-5596.
- (94) Liu L, Tewari RP, Williamson PR. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun* 1999;67:6034-6039.
- (95) van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3394-3400.
- (96) Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 1994;176:656-664.
- (97) Walton FJ, Idnurm A, Heitman J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2005;57:1381-1396.
- (98) Hull CM, Heitman J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet* 2002;36:557-615.
- (99) Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 2005;307:1321-1324.
- (100) Kwon-Chung K. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:381-389.
- (101) Wickes BL, Moore TD, Kwon-Chung KJ. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 1994;140:543-550.
- (102) Murray P, Jo Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Methods*. In: Woods GL. *Manual of Clinical Microbiology*. sixth ed. Washington, DC: ASM Press; 1995. p. 1327-1341.
- (103) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline M44-A*. Wayne Pa; 2004.
- (104) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3*. 3rd ed. Wayne Pa; 2008.
- (105) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 2nd ed. M27-A2*. Wayne Pa: NCCLS; 2002.
- (106) Espinel-Ingroff A. Standardization of antifungal susceptibility testing: review update. *Rev Iberoam Micol* 1996;13:64-68.
- (107) Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, et al. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995;33:1104-1107.

- (108) Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis* 1997;24:776-784.
- (109) Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006;44:819-826.
- (110) Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:398-405.
- (111) Witt MD, Lewis RJ, Larsen RA, Milefchik EN, Leal MA, Haubrich RH, et al. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. *Clin Infect Dis* 1996;22:322-328.
- (112) Espinel-Ingroff A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. *Rev Esp Quimioter* 2000;13:161-166.
- (113) Larsen RA, Bauer M, Thomas AM, Sanchez A, Citron D, Rathbun M, et al. Correspondence of *in vitro* and *in vivo* fluconazole dose-response curves for *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3297-3301.
- (114) Drobnic L. Diagnóstico y Tratamiento de las Infecciones en Atención Primaria. 5ª ed. Barcelona: P&G Pharmaceuticals; 2008.
- (115) Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis* 1999;1:273-283.
- (116) Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, Perfect JR, Horwith G, Lee L, et al. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis* 1998;26:1383-1396.
- (117) Cagnoni PJ, Walsh TJ, Prendergast MM, Bodensteiner D, Hiemenz S, Greenberg RN, et al. Pharmacoeconomic analysis of liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients. *J Clin Oncol* 2000;18:2476-2483.
- (118) Bennett JE, Dismukes WE, Duma RJ, Medoff G, Sande MA, Gallis H, et al. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N Engl J Med* 1979;301:126-131.
- (119) Vermes A, Guchelaar HJ, van Kuilenburg AB, Dankert J. 5-Fluorocytosine-Related Bone-Marrow Depression and Conversion to Fluorouracil: a Pilot Study. *Fundam Clin Pharmacol* 2002;16:39-47.
- (120) Hossain MA, Mukherjee PK, Reyes G, Long L, Ghannoum MA. Effects of fluconazole singly and in combination with 5-fluorocytosine or amphotericin B in the treatment of cryptococcal meningoencephalitis in an intracranial murine model. *J Chemother* 2002;14:351-360.
- (121) Barchiesi F, Gallo D, Caselli F, Di Francesco LF, Arzeni D, Giacometti A, et al. *In vitro* interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:65-70.

- (122) Serena C, Fernandez-Torres B, Pastor FJ, Trilles L, Lazera Mdos S, Nolard N, et al. *In vitro* interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2994-2996.
- (123) Akins RA. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 2005;42:285-318.
- (124) Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, López-Ribot JL. Current developments in antifungal agents. *Curr Med Chem Anti Infective Agents* 2004;3:297-323.
- (125) Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Alvarado E. Mecanismes d'acció dels antifungics i resistència en llevats. *Treballs de la SCB*. 2004;55:187-195.
- (126) Torres-Rodríguez JM, del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M. *Micología Médica*. Barcelona: Masson S.A.; 1993.
- (127) Greer ND. Posaconazole (Noxafil): a new triazole antifungal agent. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2007;20:188-196.
- (128) Viviani MA, Tortorano AM, Pagano A, Vigevani GM, Gubertini G, Cristina S, et al. European experience with itraconazole in systemic mycoses. *J Am Acad Dermatol* 1990;23:587-593.
- (129) Serena C, Pastor FJ, Marine M, Rodriguez MM, Guarro J. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:162-165.
- (130) Barchiesi F, Spreghini E, Schimizzi AM, Maracci M, Giannini D, Carle F, et al. Posaconazole and amphotericin B combination therapy against *Cryptococcus neoformans* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3312-3316.
- (131) Del Palacio A. Anidulafungin: a new echinocandin for the treatment of mycosis. *Rev Iberoam Micol* 2008;25:74-77.
- (132) Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WK, Shyr JM, et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:512-517.
- (133) Drummond ED, Reimao JQ, Dias AL, de Siqueira AM. Behaviour azole fungicide and fluconazole in *Cryptococcus neoformans* clinical and environmental isolates. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40:209-211.
- (134) Speller DC, Fakunle F, Cairns SA, Stephens M. Cryptococcal meningitis complicating systemic lupus erythematosus: two patients treated with flucytosine and amphotericin B. *J Clin Pathol* 1977;30:254-261.
- (135) Khyriem AB, Sujatha S, Parija SC. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B and fluconazole. *Indian J Pathol Microbiol* 2006;49:307-308.
- (136) Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, Dyakopu N, Meintjes G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. *Clin Infect Dis* 2006;43:1069-1073.

- (137) van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2014-2020.
- (138) Chandener J, Adou-Bryn KD, Douchet C, Sar B, Kombila M, Swinne D, et al. In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:506-508.
- (139) Chang WN, Huang CR, Lei CB, Lee PY, Chien CC, Chang HW, et al. Serotypes of clinical cerebrospinal fluid *Cryptococcus neoformans* isolates from southern Taiwan and their in vitro susceptibilities to amphotericin B, fluconazole, and voriconazole. *Jpn J Infect Dis* 2004;57:113-115.
- (140) Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Eraso E, Canton E, Peman J. *In vitro* antifungal activity of voriconazole: New data after the first years of clinical experience. *Rev Iberoam Micol* 2007;24:198-208.
- (141) Booth JL, Vishniac HS. Urease testing and yeast taxonomy. *Can J Microbiol* 1987;33:396-404.
- (142) Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis* 1998;4:71-83.
- (143) Torres-Rodríguez JM, Hermoso de Mendoza M, Alvarado-Ramírez E, Segura-Roca G. Cryptococcosis by *Cryptococcus gattii* in immunocompetent goats in Spain and review of the literature. 2006;34:245-253.
- (144) Prabhakaran K, Harris EB, Kirchheimer WF. Effect of inhibitors on phenoloxidase of *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol* 1969;100:935-938.
- (145) Vidotto V, Defina N, Pugliese A, Aoki S, Nakamura K, Takeo K. Effect of different K⁺ concentrations on *Cryptococcus neoformans* phenoloxidase activity. *Mycopathologia* 2002;156:171-176.
- (146) Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* 1996;184:377-386.
- (147) Tanaka E, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S, Vidotto V, Ito M. Comparisons of the laccase gene among serotypes and melanin-deficient variants of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Immunol* 2005;49:209-217.
- (148) Sharpton TJ, Neafsey DE, Galagan JE, Taylor JW. Mechanisms of intron gain and loss in *Cryptococcus*. *Genome Biol* 2008;9:24.
- (149) Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2008;36:13-21.
- (150) Tanaka R, Nishimura K, Imanishi Y, Takahashi I, Hata Y, Miyaji M. Analysis of serotype AD strains from F1 progenies between urease-positive- and negative-strains of *Cryptococcus neoformans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2003;44:293-297.
- (151) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-410.

- (152) Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res. 2004;5:1-10.
- (153) Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC, Vainstein MH. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. Med Mycol 2008;46:377-383.
- (154) Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, et al. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. Med Mycol 1998;36:335-339.
- (155) Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). J Clin Microbiol 2005;43:2163-2167.
- (156) Morera-Lopez Y, Torres-Rodriguez JM, Jimenez-Cabello T, Baro-Tomas T. *Cryptococcus gattii*: *in vitro* susceptibility to the new antifungal albaconazole versus fluconazole and voriconazole. Med Mycol 2005;43:505-510.
- (157) Pasqualotto AC, Denning DW. New and emerging treatments for fungal infections. J Antimicrob Chemother 2008;61:19-30.
- (158) Catanzaro A, Cloud GA, Stevens DA, Levine BE, Williams PL, Johnson RH, et al. Safety, tolerance, and efficacy of posaconazole therapy in patients with nonmeningeal disseminated or chronic pulmonary coccidioidomycosis. Clin Infect Dis 2007;45:562-568.
- (159) Lopez-Jodra O, Torres-Rodriguez JM, Mendez-Vasquez R, Ribas-Forcadell E, Morera-Lopez Y, Baro-Tomas T, et al. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method. J Antimicrob Chemother 2000;45:645-649.
- (160) Torres-Rodriguez JM, Morera Y, Baro T, Lopez O, Alia C, Jimenez T. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* serotypes to GM 237354 derivative of the sordarin class. Mycoses 2002;45:313-316.
- (161) Morera-Lopez Y, Torres-Rodriguez JM, Jimenez-Cabello T. *In vitro* susceptibility of fungal and yeast clinical isolates to itraconazole and voriconazole. Rev Iberoam Micol 2005;22:105-109.
- (162) Morera-Lopez Y, Torres-Rodriguez JM, Jimenez-Cabello T, Baro-Tomas T, Alia-Aponte C, Lazera MS. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. Mycopathologia 2005;160:9-14.
- (163) Torres-Rodriguez JM, Mendez R, Lopez-Jodra O, Morera Y, Espasa M, Jimenez T, et al. *In vitro* susceptibilities of clinical yeast isolates to the new antifungal eberconazole compared with their susceptibilities to clotrimazole and ketoconazole. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1258-1259.
- (164) Torres-Rodriguez JM, Alvarado-Ramirez E, Murciano F, Sellart M. MICs and minimum fungicidal concentrations of posaconazole, voriconazole and fluconazole for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. J Antimicrob Chemother 2008; 62:205-206
- (165) Arias TD, Tapa JL. Glosario de Medicamentos: Desarrollo, Evaluación y Uso. Pan American Health Organization; 1999.

(166) Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG, Walsh TJ. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 2002;40:3204-3208.

(167) Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, et al. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 1998;177:425-430.

(168) Walsh TJ, Lee JW, Melcher GP, Navarro E, Bacher J, Callender D, et al. Experimental *Trichosporon* infection in persistently granulocytopenic rabbits: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of an emerging opportunistic mycosis. *J Infect Dis* 1992;166:121-133.

(169) Walsh TJ, Melcher GP, Rinaldi MG, Lecciones J, McGough DA, Kelly P, et al. *Trichosporon beigeli*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1990;28:1616-1622.



Anexo

EVALUATION OF E-TEST® METHOD COMPARED WITH M27-A2 BROTH MICROWIDILUTION ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF POSACONAZOLE AGAINST *Cryptococcus neoformans* AND *Cryptococcus gattii*

Alvarado, Eidi; Torres-Rodríguez, Josep M.; Murciano, Francisca; Sellart, Maite
Infectious Disease and Mycology Research Unit. Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona and UDIMAS; Autonomous University of Barcelona.

INTRODUCTION

The standardization of antifungal susceptibility is an area of major research interest. The reference broth microdilution method M27-A2 published by CLSI is a useful technique to determine minimum inhibitory concentration (MICs) of yeasts, but is not easy to perform in a routine laboratory. Among the alternative methods the E-test® strip in agar-RPMI medium is an easy and available assay for all commercial antifungal agents. Posaconazole

(PNZ) is the newest triazole antifungal agent used for the treatment of severe fungal infections, including cryptococcosis. This study was undertaken to compare the performance of the E-test with RPMI 1640 supplemented with 2% glucose medium in determining the MICs of clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* to Posaconazole.

MATERIAL AND METHODS

The MICs of eighty clinical isolates of the two species of *Cryptococcus* from different countries; were determined using two different assays.

1. Microbroth method: RPMI 1640 buffered to pH 7 with MOPS plus 2% glucose broth medium. The microplates and the Posaconazole stock solution in dimethyl sulfoxide (16 µg/mL) were prepared according to M27-A2 guidelines instructions. Yeast inoculum was McFarland 0.5.

2. E-Test®: The MICs values of E-test® method were obtained by seeding *Cryptococcus* cells in agar-RPMI medium, incubated at 35°C for 48-72 hours, as it has been described by

the manufacturers (AB BIODISK, Sweden). Yeast inoculum of 1 McFarland was used. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were employed as quality control for both media, lectures were done at 24 hours.

The MICs values, range, MICs 50% and 90%, geometric mean (GM) and the agreement between the methods were obtained. The agreement between both techniques were considered meanwhile not shown values upper than 2 log₂ antifungal dilution.

The difference values obtained were analysis with the Bland and Altman program for statistical significance.

RESULTS

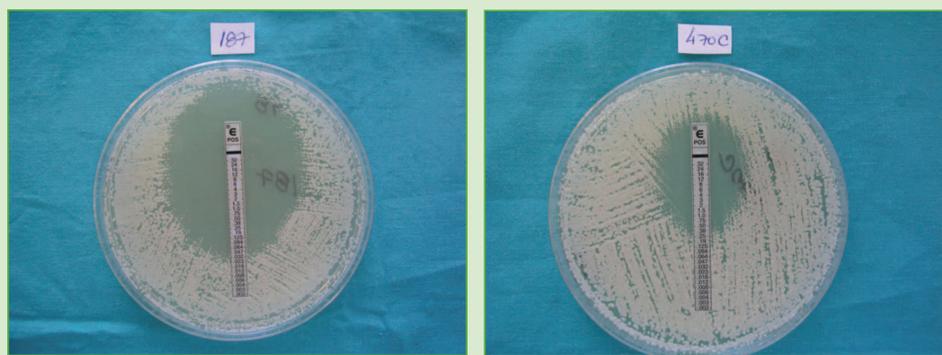
Table 1 shows the values of MICs range, MICs 50%, MICs 90% and GM obtained with each technique. The percentage of agreement between both techniques is also shown. The MICs range obtained was very similar with the M27-A2 and E-test®, <0,03-0,5 µg/mL y 0,032-1,0 µg/mL; respectively.

There is no significant difference between the values of MIC 50% and MIC 90% obtained with both methods, no more than 2 log₂ antifungal dilution.

The agreement obtained between the E-test® strips with agar RPMI medium and the reference method M27-A2 was 100%.

Table 1. Values of MICs, range, MIC50, MIC90, geometric means of susceptibility of posaconazole and agreement between the reference method M27-A2 and Etest strips.

Technique	Range	MIC50	MIC90	GM	%Agreement
Posaconazole M27-A2	<0,03-0,5	0,12	0,25	0,1	-
Posaconazole E-test® agar RPMI	0,032-0,5	0,25	0,5	0,2	100



CONCLUSIONS

Determine antifungal susceptibility of Posaconazole against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* using E-test® in agar RPMI medium is a fast, simple and reliable technique, which can be used as a good alternative of the reference method M27-A2 in the routine microbiology laboratories.

The results of this study suggest that E-test is a suitable method for testing the susceptibility of *C. neoformans* and *C. gattii* to Posaconazole. E-test is less labour intensive and much simpler to use than the reference broth microdilution method and as such is convenient for routine susceptibility testing of Posaconazole.

Table 2. Individual MICs value of 80 strains of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* and its serotypes.

STRAIN <i>C. neoformans</i> (A)	MIC M27-A2	Etest	STRAIN <i>C. neoformans</i> (D)	MIC M27-A2	Etest
95A	0,25	0,25	1C	0,25	0,25
97A	0,12	0,25	2C	0,25	0,25
118A	0,25	0,25	3C	0,12	0,5
119A	0,06	0,032	6C	0,12	0,25
148A	0,25	0,25	13C	0,12	0,25
17C	<0,03	0,032	32C	<0,03	0,032
19C	0,06	0,125	94C	0,12	0,25
148C	0,06	0,032	97C	<0,03	0,125
469C	0,12	0,25	125C	0,06	0,064
473C	0,25	0,25	213C	0,06	0,125
101C	0,12	0,125	399C	<0,03	0,016
102C	0,12	0,125	21C	0,06	0,125
108C	0,12	0,064	35C	0,06	0,064
109C	0,25	0,125	38C	0,12	0,125
112C	0,25	0,25	188C	<0,03	0,064
302C	0,06	0,064	145C	0,06	0,125
304C	0,06	0,25	192C	0,12	0,25
306C	0,12	0,125	183C	0,25	0,064
307C	0,12	0,125	191C	0,12	0,125
312C	0,12	0,125	311C	<0,03	0,064
332C	0,12	0,064	182C	<0,03	0,064
333C	0,12	0,125	187C	0,06	0,032
334C	0,25	0,5	309C	0,12	0,064
335C	0,12	0,125	181C	0,12	0,25
339C	0,25	0,5	179C	0,12	0,032
STRAIN <i>C. gattii</i> (C)	MIC M27-A2	Etest	STRAIN <i>C. gattii</i> (B)	MIC M27-A2	Etest
417C	0,25	0,125	169C	0,12	0,125
160A	0,25	0,125	48A	0,12	0,5
24C	0,25	0,125	50A	0,25	0,5
475C	0,06	0,125	52A	0,12	0,25
476C	0,12	0,125	53A	0,12	0,5
			56A	0,25	0,5
			58A	0,25	0,5
			59A	0,25	0,5
			60A	0,25	0,25
			470C	0,25	0,25
			163C	0,25	0,25
			170C	0,12	0,125
			171C	0,12	0,25
			172C	0,12	0,25
			173C	0,12	0,25
			174C	0,25	0,25
			331C	0,12	0,125
			168C	0,12	0,125
			175C	0,12	0,5
			257C	0,12	0,064
			258C	0,12	0,125
			416C	0,5	0,25
			260C	0,06	0,25
			259C	0,06	0,064
			261C	0,12	0,25

8 Anexo

Poster P010: presentado en *3rd Trends in Medical Mycology*, Torino 28-31 octubre 2007.

Evaluation of Etest® method compared with M27-A2 broth microdilution antifungal susceptibility testing of Posaconazole against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*.

Alvarado-Ramírez, Eidi; Torres-Rodríguez, Josep M.; Murciano, Francisca; Sellart-Altisent, Maite.

Infectious Disease and Mycology Research Unit. Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona and UDIMAS; Autonomous University of Barcelona.

Introduction. The standardization of antifungal susceptibility is an area of major research interest. The reference broth microdilution method M27-A2 published by CLSI is a useful technique to determinate minimum inhibitory concentration (MICs) of yeasts, but is not easy to performance in a routine laboratory. Among the alternative methods the Etest® strip in agar-RPMI medium is an easy and available assay for all commercial antifungal agents.

Posaconazole (PNZ) is the newest triazole antifungal agent used for the treatment of severe fungal infections, including Cryptococcosis. The main goal of this study is to analyze the agreement between the reference method and the Etest® in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* when there are used for susceptibility testing to PNZ.

Materials and Methods. The MICs of eighty clinical isolates of two species of *Cryptococcus* from different countries; were determinate using two different assays.

1) Microbroth method: RPMI 1640 buffered to pH 7 with MOPS plus 2% glucose broth medium. The microplates and the Posaconazole stock solution in dimetil sulfoxide (16 µg/mL) were prepared according to M27-A2 guidelines instructions. Yeast inoculum of 0.5 McFarland was used.

2) Etest®: The MICs values of Etest® method were obtained by seeding *Cryptococcus* cells in agar-RPMI medium, incubated at 35°C for 48-72 hours, as it has been described by the manufacturers (AB BIODISK, Sweden). Yeast inoculum of 1 McFarland was used.

Candida parapsilosis ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were employed as quality control for both media, lectures were done at 24 hours.

The MICs values, range, MIC50 and MIC90, geometric mean (GM) and the agreement between the methods were obtained. The agreement between both techniques was considered values less than 2 log₂ antifungal dilution.

The difference values obtained were analyzed with the Bland and Altman program for statistical significance.

Results. Table 1 shows the values of MICs range, MIC50, MIC90 and GM obtained with each technique. The percentage of agreement between both techniques is also shown.

The MICs range obtained was very similar with the M27-A2 and Etest®, <0,03-0,5 µg/mL y 0,032-1,0 µg/mL; respectively.

There is no significant difference between the values of MIC50 and MIC 90 obtained with both methods, ≤ 2 log₂ antifungal dilutions.

The agreement obtained between the Etest® strips and the reference method M27-A2 was 100%.

Conclusions. Determine antifungal susceptibility of Posaconazole against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* using Etest® in agar RPMI medium is a fast, simple and reliable

technique, which can be used, in the routine microbiology laboratories, as a good alternative to the microdilution reference method.

Technique	Range	MIC 50%	MIC 90%	GM	%Agreement
PNZ M27-A2	<0,03-0,5	0,12	0,25	0,1	-
PNZ Etest® agar RPMI	0,032-0,5	0,25	0,5	0,2	100

**Table 1. Values of MIC, range, MIC 50%, MIC 90%, geometric mean (GM) of susceptibility of posaconazole (PNZ) and agreement between the reference method (M27-A2) and Etest® strips. *Cryptococcus neoformans* (N=50) and *C. gattii* (N=30).
Poster.**