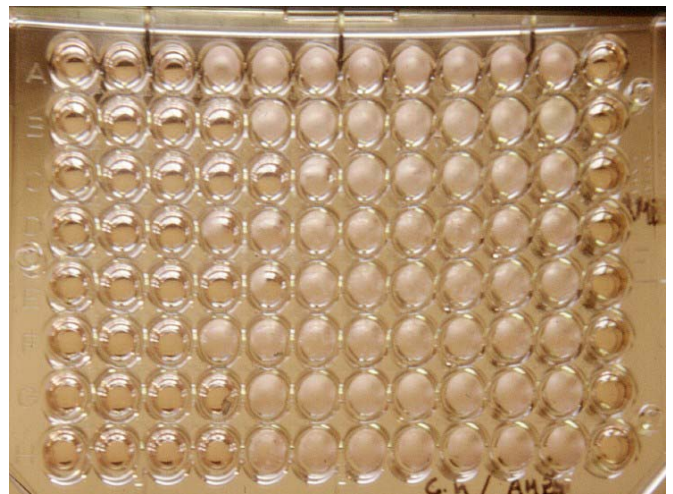
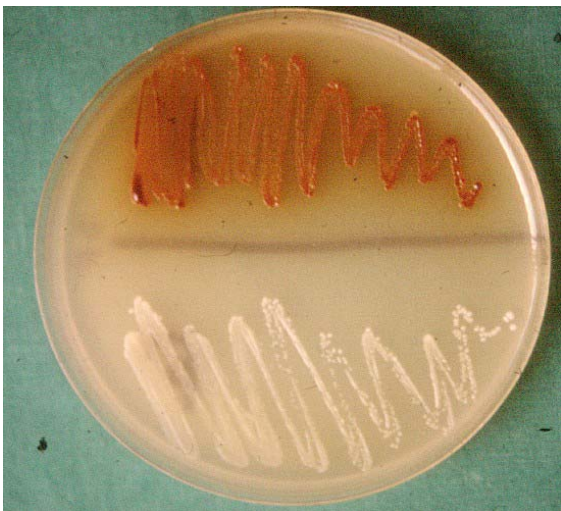
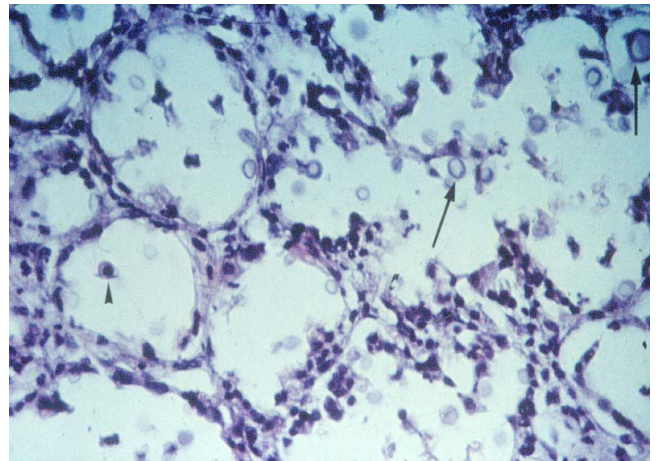
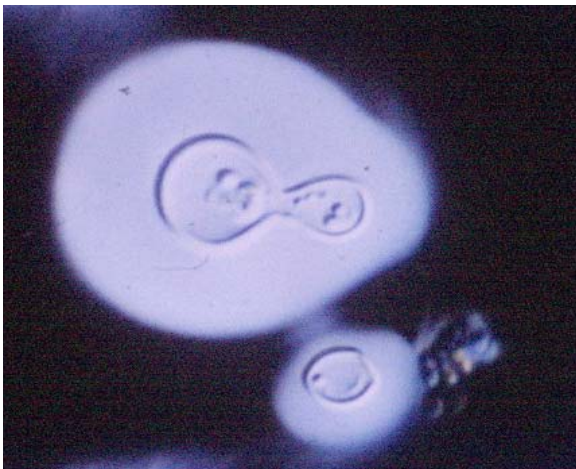


Epidemiología de la Criptococosis en España.

Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*.



María Teresa Baró Tomás
Tesis Doctoral
Universitat Autònoma de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA.

Epidemiología de la Criptococosis en España.
Caracterización de los aislados de
***Cryptococcus neoformans*.**

Tesis presentada por M^a TERESA BARÓ TOMÁS
para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Director de tesis Josep M^a Torres Rodríguez

Barcelona, 2002

Este trabajo se ha podido realizar gracias a dos becas del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) concedidas en los años 1996 y 1998 con los expedientes 96/1991-01 y 98/0374.

**A Jorge, Jordi y Sílvia por su gran ayuda y cariño,
y a mis padres.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento más sincero a todas las personas que han colaborado en la realización de esta tesis doctoral:

Al Dr Josep M^a Torres Rodríguez, Profesor Titular del Departament de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, que además de ser mi director de tesis es un gran amigo que siempre ha confiado en mí.

A mi gran amiga y compañera la Dra Concepción Alía Aponte que sin su incansable soporte ante todos los obstáculos ha posibilitado la finalización de esta tesis doctoral.

A todos los compañeros del Servicio de Micología Médica, Olga López-Jodra, Raul Méndez, Eduard Ribas, y en especial a Yolanda Morera y Teresa Jimenez que gracias a todos ellos se ha podido realizar el trabajo de investigación.

Al Dr Sergi Serrano, Catedrático de Patología de la Universitat Autònoma de Barcelona, y Jefe del Servicio de Patología del Hospital del Mar, por su estímulo en la finalización de esta tesis.

A mi compañera reciente, pero sin embargo gran amiga, la Dra M^a Luisa Mariñoso del Servicio de Patología, por su asesoramiento y ayuda desinteresada.

Al Dr Josep M^a Corominas, Profesor Titular de Patología de la Universitat Autònoma de Barcelona, con el cual he podido realizar trabajos colaborativos tanto en el campo de la microbiología como de la patología.

A mis compañeras Pilar García y Rosa Martínez del Laboratorio de Inmunohistoquímica que han sido tan solidarias conmigo y han posibilitado la finalización de esta tesis.

A los Drs Saballs, Gimeno, López-Colomer y Drobnic del Servicio de Infecciosas del Hospital del Mar y a la Sta Pilar Colomer Mon, enfermera del Centro de Día, por su inestimable ayuda en la toma de muestras y el seguimiento de los pacientes.

Por su desinteresada colaboración, a la Dra Raquel Hernandez, del Servicio de Cirugía del Hospital del Mar que procedió a la colocación de los catéteres en los animales de experimentación.

A los Drs Carmen Casadevall, Olga Pol y José Palacios del Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), por su asesoramiento en determinadas fases de una técnica.

Quisiera hacer una mención especial para el Dr Miguel Hermoso de Mendoza de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, por ser un gran compañero y que gracias a su gran interés científico se ha podido hallar la variedad *gattii* en España.

A todos los compañeros y colegas de España y Latinoamérica que de forma desinteresada han remitido los cultivos a partir de los cuales se ha podido realizar esta tesis. Espero no olvidarme de nadie.

Drs Saballs y Gimeno Hospital del Mar, Dr Alonso, Hosp de la Creu Roja, Dr Puig de la Bellacasa, Hosp Clínic de Barcelona, Dra M. Morta del Hosp General de Manresa, Dra A. López , Hosp Univ Sondureta, Mallorca, Dra LL. Martínez Pay, Hosp La Fé de Valencia, Dra F Colom, Univ Miguel Hernandez, Alicante, Dra E Martín, Hosp Valme de Sevilla, Dr J. Berenguer, Hosp Gregorio Marañón, Madrid, Dr M Hermoso de Mendoza, Fac Veterinaria ,Univ Extremadura, Drs J. Pontón y G Quindós , Univ del País Vasco, Dr J.A. García Rodríguez , Hosp Univ de Salamanca.

Dr G. Martínez , Institución Pedro Kourí, La Habana , Cuba, Drs Negroni y A Arechavala, Hosp Muniz de Buenos Aires , Argentina, Dr L.C. Severo, Santacasa, Porto Alegre, Brasil, Dres B Wanke y M Làzera de Fundación Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil, Dr F. Queiroz Univ de Paraná, Brasil.

ABREVIATURAS:

A₄₂₀: Lectura de la absorbancia a 420 nanómetros

ABCD: Anfotericina B en dispersión coloidal

ABLC: Anfotericina B en complejo lipídico

ABS: Suero absorbido

ADN: Acido desoxirribonucleico

AFPL: Amplified fragment length polymorphism

AMB: Anfotericina B

AMB-L: Anfotericina B liposomal

ARN: Acido ribonucleico

ATCC: Cepas del American Type Culture collection

CGB: Medio de L-canavanina-glicina-azul de bromotimol

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CIM₅₀: Concentración de antifúngico en que se inhibe el 50% de las cepas

CIM₉₀: Concentración de antifúngico en que se inhibe el 90% de las cepas

CINa: Cloruro sódico

DMSO: Dimetil sulfóxido

dNTPs: Deoxinucleósido trifosfatos

EF-2: Factor de elongación

FC: 5- Fluorocitosina

FNC: Fluconazol

GA: Medio de *Guizotia abyssinica* (semillas de “negrito”

GXM: Glucuroxilomanano

HC, BC: Hemocultivo

INH: Institut National Health

ITZ: Itraconazol

I/V: Intravenoso

KCl: Cloruro potásico

KETO: Ketoconazol

LCR, CFS: Líquido cefalorraquídeo

MAT: *Mating*, células haploides

MgCl₂: Cloruro magnésico

MOPS: N-morpholino-propanesulfónico

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PBS: Tampón fosfato salino

RAPD: Técnica del random amplification of polymorphic DNA

RV: Cepas de la colección de Raymond Vanbreuseghem (Bélgica)

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SF: Medio de *Sunflower* (semillas de girasol)

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNC: Sistema nervioso central

SP: Especie

TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad

TE: Tampón de extracción

UFC: Unidad formadora de colonias

VAR: Variedad

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VIH+: Paciente infectado por el VIH

YNB: Medio de *yeast nitrogen base*

I. INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una micosis profunda que puede afectar al ser humano y a diversos animales. El agente causal de este proceso es una levadura encapsulada llamada *Cryptococcus neoformans*.

La criptococosis puede presentarse en personas sanas, pero afecta sobre todo a sujetos que tienen algún grado de inmunodepresión o con enfermedades debilitantes, transplantados y pacientes tratados con corticoides que disminuyen su capacidad de respuesta. Puede ser una micosis de curso subagudo o crónico. La infección se inicia por la inhalación de las levaduras que alcanzan los alveolos pulmonares y a partir de esta localización puede diseminarse por vía hematógica al sistema nervioso central.

Esta infección micótica, era poco frecuente hasta la década de los ochenta, en que ha aumentado significativamente su tasa de incidencia debido la aparición del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA). (Kwon-Chung, 1992)

Se han descrito dos agentes causales que producen esta infección, los anamorfos *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* que difieren por su ecología y patogenicidad. La variedad *neoformans* es cosmopolita y afecta sobre todo a pacientes con un grado de inmunodepresión, mientras que la variedad *gattii* se la aísla en áreas más restringidas y se la ha relacionado con la presencia de árboles como *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*. Se ha descrito que esta variedad puede afectar a personas con inmunidad celular normal.

1. HISTORIA

En 1894, el científico italiano F. Sanfelice , fundador del Instituto de Higiene de la Universidad de Caligari en Cerdeña, aisló una levadura capsulada (Sanfelice, 1894) a partir del zumo de melocotón fermentado a la que clasificó como *Saccharomyces neoformans*. (Sanfelice, 1895). Este investigador demostró su patogenicidad inoculando esta levadura en animales de experimentación y observó que se producían lesiones cerebrales en las cobayas.

Al mismo tiempo, en Alemania, Otto Busse (1894) y Abraham Buschke (1895), notificaron, por separado, el primer aislamiento de un hongo de características similares a partir de una lesión pseudosarcomatosa de la tibia en una mujer de 31 años. El patólogo Busse descubrió formaciones redondeadas en la lesión y aisló por cultivo una levadura. La paciente murió de una enfermedad diseminada. El hongo fue denominado *Saccharomyces hominis*. (Buschke,1895 y Busse, 1894).

Ferdinand Curtis, en 1896 aisló en un absceso inguinal de un joven francés de Lille , un “parásito vegetal” perteneciente a una especie de levadura que parecía causar tumores mixomatosos. Curtis obtuvo, al inocular subcutáneamente diversos animales de experimentación, la formación de enormes lesiones tumorales en pulmones, bazo y riñones. Curtis nombró esta cepa como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*. (Curtis, 1896).

En 1901, Jean Paul Vuillemin de la Universidad de Nancy, en Francia al estudiar esta levadura no encontró las típicas ascosporas del género *Saccharomyces*. Observó, además que no fermentaba los carbohidratos y la clasificó en el género *Cryptococcus*. (Vuillemin, 1901). Nombró al primer aislado clínico de Busse como *Cryptococcus hominis* y *C. neoformans* para el aislamiento de Sanfelice.

Aunque se ha sugerido que la primera descripción de una meningitis criptocócica se debe a Zenker en 1861, no se obtuvo cultivo, por lo que se atribuye a Von Hansemann en 1905, la primera observación de la levadura en un caso de meningitis. (Hansemann, 1905).

En 1916, Stoddard y Cutler, autores americanos, describieron los aspectos clínicos de la enfermedad y le dieron el nombre de *Torula histolytica* (Stoddard, 1916) ya que observaron una zona lítica alrededor de los tejidos del huésped que en realidad correspondía al material capsular de la levadura. Este término de *Torula* se usó durante un largo período de tiempo.

Todos estos diferentes nombres que recibió esta levadura crearon una cierta confusión hasta que en 1935, Rhoda Benham de la Universidad de Columbia de Nueva York, definió los caracteres morfológicos y serológicos y los criterios de identificación de más de 40 cepas que incluían las originales de Sanfelice, Busse y Curtis. (Benham, 1935). Ella concluyó que todos los aislamientos humanos procedían probablemente de una misma especie y propuso conservar el nombre de *Cryptococcus neoformans* dado por Vuillemin.

En 1950, EE. Evans y cols. de la Universidad de Los Angeles en California, prosiguiendo los estudios de Benham, encontraron diferencias serológicas en los aislados e identificó tres serotipos A, B y C. (Evans, 1950). No fue hasta 20 años más tarde que Wilson, Bennett y Bailey identificaron el serotipo D cuya base eran las diferencias antigénicas del mucopolisacárido capsular. (Wilson, 1968).

Chester W. Emmons, en 1951, hizo un importante descubrimiento en la epidemiología de *C. neoformans*, al aislarlo de la tierra, de los nidos y heces de las palomas. (Emmons, 1951).

En 1962, Staib descubrió que *C. neoformans* producía colonias de color marrón en un medio que contenía un extracto de *Guizotia abyssinica* (semilla de “negrito”). (Staib, 1962a). Este es un medio selectivo muy usado para aislar e identificar *C. neoformans*.

F. Gatti, (1970), aisló, en el líquido cefalorraquídeo de un niño con meningitis en el Zaire, una variedad de *Cryptococcus* a la que Vanbreuseghem (1970) le puso el nombre *C. neoformans* var. *gattii* y que tenía unas características de morfología, bioquímica, serología y epidemiología diferentes de la var. *neoformans*.

Un gran avance en el conocimiento de *Cryptococcus neoformans* se produjo en 1975 cuando Kwon-Chung descubrió la reproducción sexual de esta levadura. (Kwon-Chung, 1975). Esta autora encontró dos cepas compatibles o “mating” tipos α y α . Al cruzar los dos tipos se producían basidiomicetos teleomorfos. Esta autora clasificó a la fase teleomorfa del género *Cryptococcus* en el género *Filobasidiella*.

En 1990, los autores australianos Ellis y Pfeiffer propusieron que el nicho ecológico de *C. neoformans* var. *gattii* podía estar relacionado con la madera de unas determinadas especies de eucaliptos como *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*. (Ellis, 1990a).

2. TAXONOMÍA

La clasificación de las levaduras se basa en general en las características de la reproducción sexual y asexual. Se clasifican en *Ascomycetes* formadoras de ascosporas, *Basidiomycetes* que se caracterizan por la presencia de basidiosporas y en *Deuteromycetes* u Hongos imperfectos en los que no se conoce la reproducción sexuada. En este grupo también se incluye la fase anamorfa de la forma sexuada.

Se han encontrado dos estados perfectos o telemórficos en *Cryptococcus neoformans* y se les ha denominado *Filobasidiella neoformans* para los serotipos A y D (Kwon-Chung, 1975) y *Filobasidiella bacillispora* para los serotipos B y C (Kwon-Chung, 1976).

Filobasidiella bacillispora difiere de *Filobasidiella neoformans* en que ésta produce basidiosporas de forma globosa y ovalada con paredes rugosas mientras que *F. bacillispora* tiene las basidiosporas con paredes lisas. Un cruce entre el tipo de cultivo de *F. neoformans* y *F. bacillispora* produce basidias con esporas de ambas clases, pero son estériles. (Kwon-Chung, 1978).

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

La clasificación taxonómica basada en los estudios anteriores y en las secuencias de nucleótidos de RNA ribosomal de *F. neoformans* (Guého, 1989 y 1993) es la siguiente:

	2.1. Fase anamorfa	2.2. 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> o <i>gattii</i>	<i>neoformans</i> o <i>bacillispora</i>

En la fase anamorfa, se ha separado *Cryptococcus* según determinados serotipos:

C. neoformans var.*neoformans* (serotipo A)

C. neoformans var.*neoformans* (serotipo D)

C. neoformans var.*gattii* (serotipos B y C).

Recientemente se ha propuesto la separación de los serotipos A y D de *C. neoformans* var. *neoformans* en las variedades *grubii* y *neoformans* respectivamente. (Franzot, 1999). El análisis de la secuencia nucleotídica del gen *URA5* parece evidenciar las diferencias entre los dos serotipos. (Franzot, 1998).

3. REPRODUCCIÓN SEXUAL

En los hongos, la reproducción puede ser asexual o sexual. La forma asexual resulta de la división de esporas sin que haya habido fertilización previa por unión del material nuclear. Este proceso se puede producir indefinidamente.

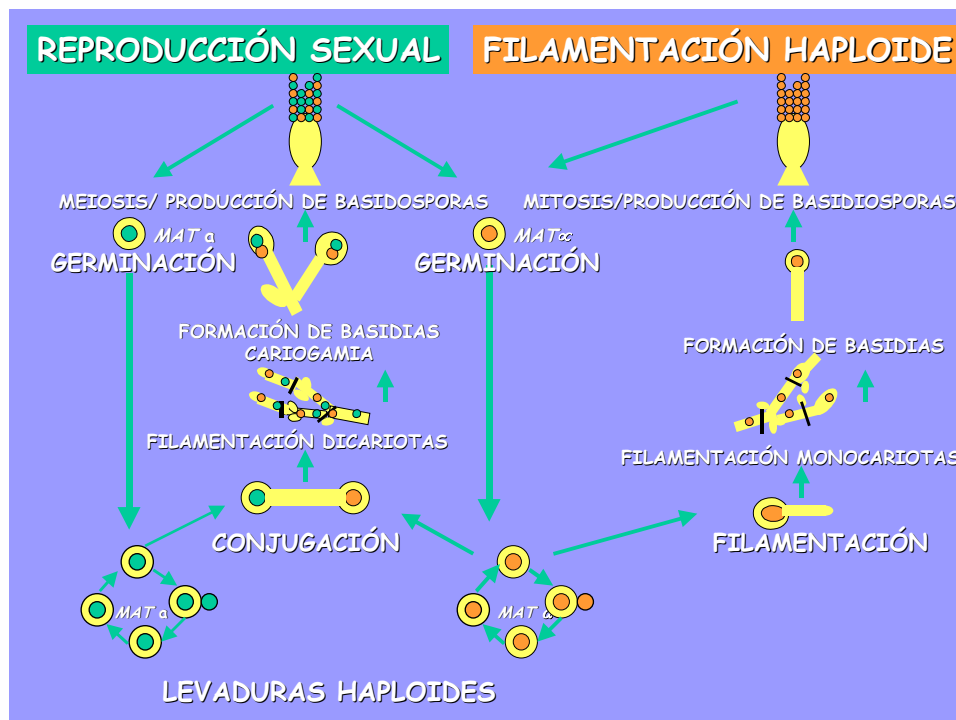
Cryptococcus neoformans es una levadura que se reproduce asexualmente por gemación, es unicelular aunque se ha encontrado cepas productoras de hifas. (Shadomy, 1966). Este fenómeno se puede observar sin que se haya producido cruce entre las cepas. Shadomy sugirió que *C. neoformans* podría pertenecer a los Basidiomycetes.

En 1975, Kwon-Chung obtuvo por primera vez la forma sexual (telomorfa) de *C. neoformans* (serotipo A ó D) mediante la unión de cepas haploides compatibles de signo opuesto MAT^{α} y MAT^a usando medios naturales especiales (medio "V-8 juice agar" ó "hay-infusion agar" e incubadas a temperaturas entre 25 y 37°C) y la designó como *Filobasidiella neoformans*. Un año más tarde la misma autora describió la especie *Filobasidiella*

bacillispora. Esta especie se obtuvo por la confrontación de cepas compatibles de *C. neoformans* serotipo B ó C. (Kwon-Chung, 1976).

Esta reproducción sexual se caracteriza por la formación de un micelio dicariótico con tabiques que presentan un poro central llamado doliporo y la formación de *clamp-connections*., seguido de una migración nuclear y fusión. Se produce la meiosis y esporulación con la producción de las basidiosporas

Figura 1: Ciclo sexual de *Cryptococcus neoformans*. (Adaptado de Kwon-Chung, 1992).



La morfología de las basidiosporas es diferente según la especie de *C. neoformans*. *F. neoformans* produce basidiosporas esféricas u ovales mientras que *F. bacillispora* se caracteriza por la presencia de basidiosporas más alargadas o baciliformes.

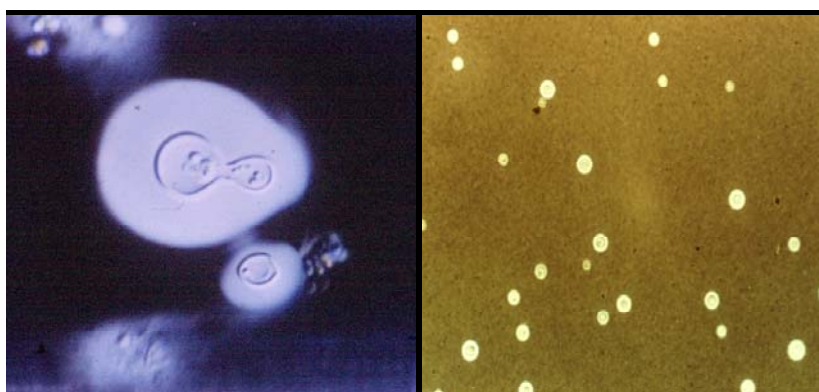
4. DESCRIPCIÓN DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Cryptococcus neoformans tiene la forma de una levadura esférica, ovoide y

a veces de forma alargada con gemación unipolar o multipolar. Crece a 37°C y no forma pseudomicelio.

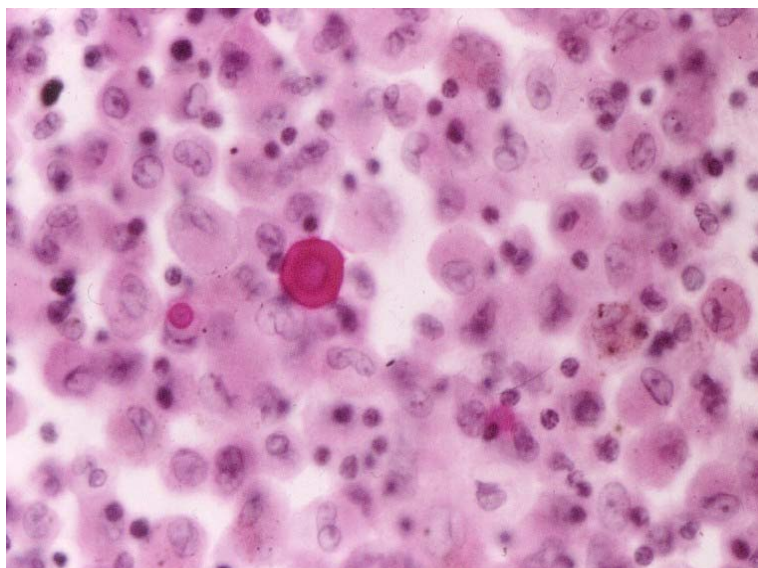
Las cepas de *C. neoformans* presentan una cápsula mucopolisacárida. Esta cápsula, en el huésped infectado, puede ser muy voluminosa con un diámetro varias veces mayor que el de la misma célula.(3,5-7 x 3,7-8 μm). En cambio, el diámetro de la cápsula se reduce cuando se realizan cultivos sucesivos e incluso se puede llegar a perder. La formación de la cápsula se estimula usando medios ricos en glucosa y con atmósfera de dióxido de carbono (CO_2). (Iralu, 1972).

Figura 2: Cápsula de *Cryptococcus neoformans*, técnica de la tinta china.



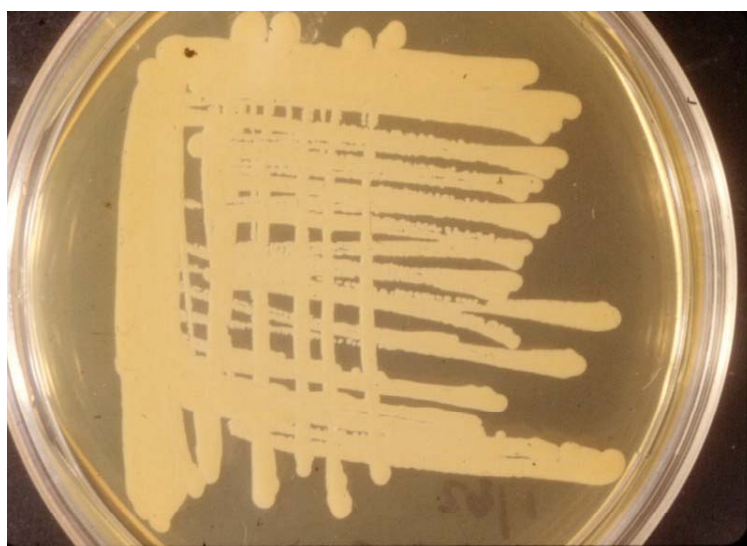
La cápsula polisacárida no se tiñe con los colorantes habituales como el Gram, Giemsa ni otros más específicos para hongos como PAS ó Gomori. Se ve por contraste negativo como un espacio claro alrededor de la célula. El uso más frecuente para su visualización es por el método de la tinta china que confiere un contraste oscuro sobre el que destaca la célula con su cápsula. A veces también ayuda la tinción específica con mucicarmín. (López, 1972).

Figura 3: Observación de la cápsula de *Cryptococcus neoformans* mediante la tinción de mucicarmín. (Paciente, Hospital del Mar).



La presencia de cápsula confiere a las colonias un aspecto mucoso, con textura cremosa, de un color blanco amarillento característico.

Figura 4: Cultivo de *Cryptococcus neoformans* sobre medio de Sabouraud.



Las cepas de *C. neoformans* son sensibles a la cicloheximida a niveles de 6 a 16 $\mu\text{g/ml}$ por tanto los medios usados para su crecimiento deben estar exentos de ella.

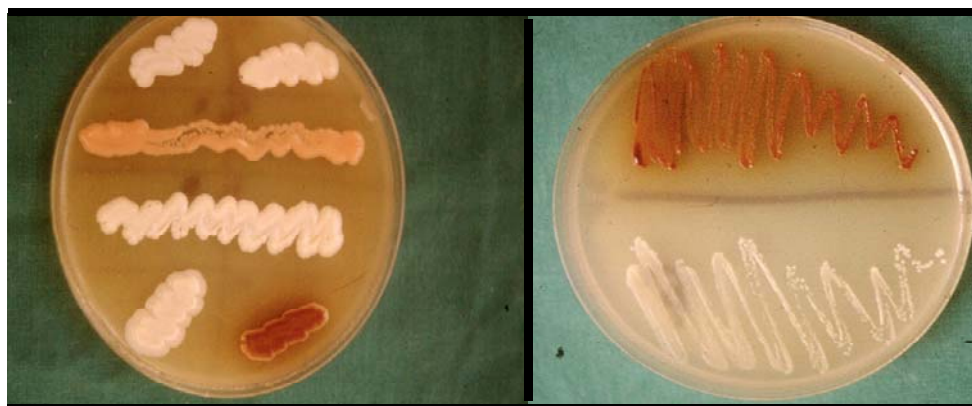
El 99% de los aislados de *C. neoformans* tienen actividad ureásica. (Zimmer, 1979). Muestran ureasa positiva a los 15 min en contraste con otras especies de levaduras que tienen la ureasa positiva a las 3 horas ó más. Existen cepas que son ureasa negativa, pero son muy raras. (Ruane, 1988).

4.1. VARIEDADES

Hasta la fecha se aceptan dos variedades de *C. neoformans*: *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii* que difieren por la morfología de las colonias, características bioquímicas y serológicas y también por su ecología.

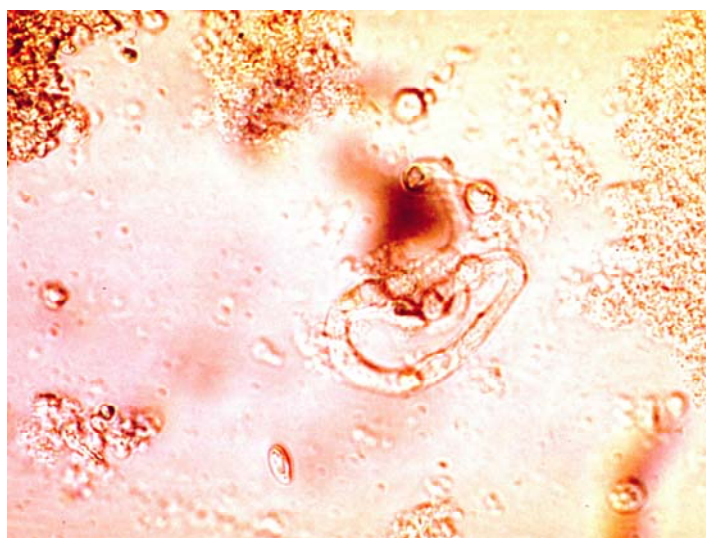
C. neoformans var. *neoformans* produce colonias lisas, de textura mucoide y coloración blanco cremosa. En medio de Sabouraud crece bien a 37°C llegando a soportar temperaturas de 39.8°C. No producen pseudomicelio, ni micelio en el estado haploide. Cuando crecen en medios que contienen compuestos difenólicos como, agar *Guizotia abyssinica* (semilla de negro) (Staib, 1987) ó agar semilla de girasol (*Helianthus annuus*) (Pal, 1982) las colonias son de color marrón oscuro al cabo de 1 a 5 días, dependiendo del aislado. Ésto se debe a la producción por parte de la levadura de una enzima, la fenoloxidasa, que convierte los sustratos hidroxibenzoicos en pigmentos marrones que imparten el color oscuro a las colonias y al medio. Para que las cepas produzcan rápidamente este pigmento melánico, la concentración de glucosa no debe exceder de 0.1% en el medio de cultivo. Estos medios son ideales cuando se hacen estudios ambientales donde se quiere diferenciar la especie *neoformans* de otras levaduras, o bien para aislarlas de una muestra clínica que esté muy contaminada por flora saprófita como pueden ser las muestras respiratorias (esputos y secreciones bronquiales) (Denning, 1990).

Figura 5: Cultivo de diferentes especies de levaduras sobre agar *Guizotia abyssinica*. (Cepas, Hospital del Mar).



C. neoformans var. *gattii* tiende a producir, a temperatura de 25°C. levaduras atípicas con formas alargadas, a parte de las típicas células redondeadas, sobre todo si se observan en el aislamiento primario. La temperatura óptima de crecimiento es de 32°C. aunque tolera temperatura de 37°C. Estas formas alargadas suelen desaparecer en los cultivos sobre medios habituales como agar Sabouraud y son reemplazadas por las formas redondeadas.

Figura 6: Observación de hifas de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en líquido cefalorraquídeo.

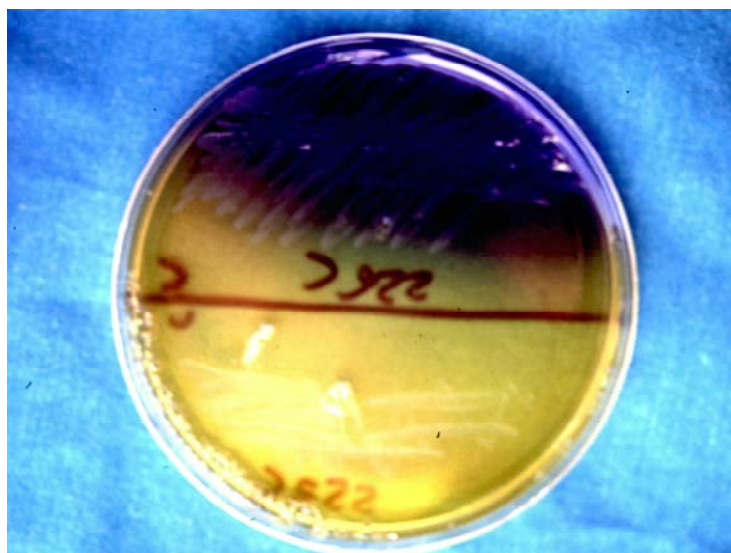


Al igual que *C. neoformans* var. *neoformans* produce colonias de color amarronado en los medios con compuestos difenólicos. (Polacheck, 1988).

Las dos variedades tienen particularidades bioquímicas que permiten

diferenciarlas, como es el metabolismo de la creatinina (Polacheck, 1980), la capacidad de crecer en medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (Kwon-Chung 1982) y la asimilación de D-prolina (Dufait 1987) y D-triptofano (Mukamurangwa 1995), como únicas fuentes de nitrógeno.

Figura 7: Crecimiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* sobre agar L-canavanina-glicina-azul de bromotimol. Observación del cambio de color del medio de amarillo a azul intenso.



C. neoformans var. *gattii* puede utilizar la creatinina como única fuente de nitrógeno. Crece en el medio de CGB ya que es resistente a la canavanina (que inhibe el crecimiento de *C. neoformans* var. *neoformans* por interferencia en la síntesis de proteínas). La utilización de la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno produce la alcalinización del medio y hay un cambio de color que pasa de amarillo a azul por cambio del indicador de pH (azul de bromotimol). La alcalinización del medio resulta de la liberación de amonio en la degradación de la glicina, (Min, 1986). Alrededor de los discos impregnados con D-prolina o con D-triptófano se observa también un crecimiento. Estas dos pruebas son negativas para la variedad *neoformans* .

4.2. SEROTIPOS

C. neoformans está envuelto por una cápsula mucopolisacárida, que interviene como factor de virulencia y determina también los diferentes serotipos. Se ha establecido que el polisacárido principal está constituido por glucuronoxilomanano (GXM). Este antígeno determina los serotipos y se acumula en los fluidos corporales. (Bhattacharjee, 1984, Cherniack, 1980, 1994, 1995). La producción de anticuerpos monoclonales contra el GXM se traduce por una reacción específica, reafirmando el papel de este polisacárido en la especificidad serotípica. El GXM de todos los serotipos contiene manosa, xilosa y ac. glucurónico. (Cherniack, 1980).

Los anticuerpos policlonales se utilizaron para caracterizar los aislados de *C. neoformans*. La base de la técnica de inmunización de conejos con células inactivadas con formol de *C. neoformans* se debe a Evans (1949). En base a las reacciones de aglutinación capsulares separó 12 cepas de *C. neoformans* en tres grupos antigénicos: A, B y C. (Evans, 1950, 1951).

El serotipo D no fue descubierto hasta unos veinte años más tarde por Vogel, (1966) y Wilson (1968). Este último autor en su estudio de 106 cepas de *C. neoformans* encontró un 70% del serotipo A, 4.7% del serotipo D, 10.4% del serotipo B y 6.6% del serotipo C. Un 3.8% de las cepas aglutinaban para el serotipo A y D a la vez. Un pequeño porcentaje, 4.7% no reaccionaba frente a ningún antisuero. Los serotipos B y C provenían sobre todo del Sur de California.

Ikeda y col. (Ikeda, 1982, Kabasawa, 1991), constataron que los cuatro serotipos poseían determinantes antigénicos comunes. El factor antigénico 1 es común a los cuatro serotipos y nos permite definir la especie *neoformans*,

el 2 se encuentra en los serotipos A, B y C, el 3 en el A y D, el 4 en el B y C, el 5 solo se halla en el serotipo B, el 6 en el C, el 7 en el A y el 8 en el D. Algunas cepas pueden aglutinar con los antisueros A y D y estos autores definen un 5º serotipo llamado AD. Los anticuerpos anticriptocócicos obtenidos en estos sueros reaccionan específicamente con epítomos antigénicos de los componentes del polisacárido que constituye la cápsula criptocócica, los glucuroxilomananos (GXM). (Eckert, 1987).

Recientemente, se ha propuesto diferenciar *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo A del serotipo D por variaciones genotípicas al analizar la secuencia del nucleótido del gen *URA5*. Se ha propuesto una nueva variedad *C. neoformans* var. *grubii*. (Franzot, 1999). A pesar de las diferencias a nivel genético, las características fenotípicas no permiten distinguirlas. La diferenciación se basa en la reactividad de determinados anticuerpos monoclonales con el polisacárido de las cepas A y D (Dromer, 1993), y posibles diferencias epidemiológicas y clínicas. (Bennett, 1977,1978, Dromer, 1996a).

5. ECOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

Antes de la aparición de la epidemia del SIDA, la criptococosis ocurría esporádicamente tanto en hombres como en animales en todo el mundo, aunque Ajello (1970), llamó la atención sobre la posible expansión de esta micosis considerándola como: *the sleeping giant among the deep mycoses*.

Un incremento espectacular se produjo a principios de la década de 1980, por la aparición de la inmunodeficiencia causada por el VIH que ha predispuesto a la adquisición de la criptococosis en este tipo de pacientes. Esta micosis se consideró que era la cuarta causa de muerte en los pacientes con SIDA hasta hace poco tiempo en que han aplicado las terapias con inhibidores de la proteasa (Viciano, 1998) y los tratamientos antiretrovirales de gran actividad (TARGA) y que han reducido

significativamente la tasa de infección por *Cryptococcus* y otros microorganismos oportunistas.

Se han descrito diferencias entre las dos variedades de *Cryptococcus* con respecto a la patogenicidad y distribución geográfica. *C. neoformans* var. *neoformans* es cosmopolita, hay datos de ella prácticamente en todos los países del mundo. En cambio *C. neoformans* var. *gattii* se ha aislado en zonas más restringidas predominando en zonas tropicales y subtropicales (Bennett, 1977, Kwon Chung, 1984). Actualmente se ha comprobado la presencia de la var. *gattii* también en zonas templadas.

C. neoformans var. *neoformans* es responsable de la mayoría de los casos de criptococosis en los pacientes inmunodeprimidos, (Rinaldi, 1986, Sukroongreung, 1996) mientras que *C. neoformans* var. *gattii* se la ha asociado con infecciones en individuos con un estatus inmunológico normal. (Ellis, 1987, Speed, 1995).

Aunque *C. neoformans* se aisló por primera vez en el estado saprófito en el zumo de melocotón por Sanfelice (1894), el hábitat natural más importante son las heces de palomas y el suelo contaminado por ellas y de otras aves. (Ajello, 1958). Emmons (1951) aisló por primera vez *C. neoformans* del suelo y en 1955 fue el primero en establecer una relación entre esta levadura y las heces de las palomas. Hay numerosas publicaciones que avalan este hallazgo. (Emmons, 1955, Ajello, 1958, Littman, 1968, Swinne, 1974 y 1979, De Vroey, 1986 y Castanon-Olivares, 1994) y también en España (Hermoso de Mendoza, 1984 y 1988, Colom, 1997). La apetencia por este sustrato por parte de *C. neoformans* var. *neoformans* se debe a su contenido en nitrógeno y creatinina y a una elevada concentración de sales. (Staib, 1962b, Walter 1968). Las levaduras pueden mantenerse viables en excrementos de paloma durante un período largo de tiempo, incluso años si están protegidas de los rayos de sol. (Littman, 1968, Swinne, 1974, Hubaleck, 1975, Cabral, 1999).

Se ha demostrado también que el buche y cloaca de las palomas puede ser un hábitat de *C. neoformans* var. *neoformans* y estas aves pueden convertirse en portadoras de esta levadura. (Swinne, 1975,1976, Hermoso de Mendoza, 1984, Sanchez-Sousa, 1993). En un trabajo realizado por Pal (1995), se aisló *C. neoformans* var. *neoformans* de la madera de jaulas limpias de canarios que habían sido almacenadas durante 8 meses.

Se ha comprobado que la entrada de *Cryptococcus* a los pulmones es por partículas que hay en el aire. Se han realizado estudios para comprobar la existencia del polvo aéreo contaminado por *C. neoformans* (Neilson, 1977, Ruiz, 1981).

Los estudios realizados por la Dra Swinne en Africa Central concretamente en Zaire (Swinne, 1986) y Burundi (Swinne,1991) demostraron que a parte de los excrementos de aves, se encontraba una tasa muy elevada de aislamiento de *C. neoformans* var. *neoformans* en muestras de aire y polvo intradomiciliario de pacientes con criptococosis asociada al SIDA.

Los criadores de aves tienen una producción de anticuerpos contra *C. neoformans* más alta de lo normal, (Fink, 1968), pero no presentan una tasa de infección mayor ya que este microorganismo requiere una disminución en las defensas, principalmente de la inmunidad celular del paciente para que se produzca infección.

El serotipo A es el tipo más común hallado en Estados Unidos de Norte América (Kwon-Chung, 1984), El serotipo D se encuentra con mayor frecuencia en determinadas áreas de Europa, Francia (Dromer,1996a), Italia (Griseo,1997, Tortorano,1997).

Estudios epidemiológicos indican que la infección causada por la variedad *gattii* es prevalente sobre todo en regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo desde el advenimiento del SIDA, la proporción de criptococosis causada por la variedad *gattii* ha disminuido por el incremento de la variedad *neoformans*. La

mayoría de pacientes con SIDA y criptococosis están infectados por la variedad *neoformans* sin importar la región geográfica. (Rinaldi,1986). La poca frecuencia de la var. *gattii* y pacientes con SIDA y criptococosis no parece ser debida a que esta levadura no esté presente en el medio ambiente. En estudios en Brasil y Sur de California se ha comprobado que la prevalencia de la var. *gattii* es la misma antes y después de la aparición del SIDA. (Kwon-Chung, 1990).

El hábitat de la var. *gattii* es menos conocido que el de la var. *neoformans*; se ha encontrado una relación entre la distribución de varias especies de *Eucalyptus*, como *E. blakely*, *E. camaldulensis*, *E. gomphocephala*, *E. rudis*, y *E. tereticornis*, con *C. neoformans* var. *gattii*. (Ellis, 1990a, Pfeiffer,1992 y 1997, Argüero, 1996, Cabral,1999, Lazera, 2000).

La mayor prevalencia de *C. neoformans* var. *gattii* se ha encontrado en Australia, Africa Central, Zaire, Brasil, Mexico, Venezuela, Sudeste de Asia. El serotipo B es el más frecuente, ya que el serotipo C queda prácticamente restringido en el sur de California. (Pfeiffer, 1991), aunque también se ha encontrado el serotipo C en Colombia a partir de muestras de almendros (Callejas, 1998).

En los primeros estudios realizados en Australia por Ellis y Pfeiffer se comprobó que había una relación entre los aislamientos de pacientes con *C. neoformans* var. *gattii* y la distribución geográfica de *E. camaldulensis* (Ellis, 1990a). Estos autores sugieren también que la dispersión de las basidiosporas es concomitante con el período de floración de estos árboles (Ellis, 1990b).

Se ha confirmado también el aislamiento de *C. neoformans* var. *gattii* en muestras ambientales en el Sur de Europa (Ellis, 1990a, Montagna,1997a y 1997b).

6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La infección criptocócica se adquiere por inhalación, aunque también puede producirse a través de una inoculación directa por lesión ó herida en la piel. (Hamann, 1997). Se ha comprobado que *C. neoformans* var. *gattii* es menos virulento en un modelo animal con ratón que *C. neoformans* var. *neoformans*. (Irokanulo, 1995).

La criptococosis causada por ambas variedades de *C. neoformans* afecta sobre todo a los pulmones y al sistema nervioso central ocasionando con mucha frecuencia meningitis fúngica. La formación de masas pseudotumorales llamadas criptococomas en pulmones y cerebro se asocia sobre todo a *C. neoformans* var. *gattii* .

6.1. CRIPTOCOCOSIS PULMONAR

En el hombre la vía de entrada inhalatoria ocasiona una primoinfección pulmonar. La criptococosis pulmonar no presenta signos y síntomas diagnósticos específicos. (McDonnell, 1985). En la mayoría de los casos suele ser asintomática. Se suele presentar con fiebre, tos, disnea, dolor pleurítico y pérdida de peso. (Campell, 1966).

En el inicio de la enfermedad ésta puede parecerse a la tuberculosis, o confundirse con neumonías virales o bacterianas. (Cameron, 1991). La infección puede remitir espontáneamente o progresar dependiendo de la capacidad de resistencia del huésped.

Las imágenes radiológicas también son inespecíficas. Las lesiones se pueden desarrollar en cualquier parte del pulmón. Consisten en infiltrados localizados, que no suelen ser muy extensos. Muchas de las lesiones son

pequeñas y con frecuencia pasan desapercibidas, la mayoría curan sin dejar granulomas. En ocasiones los focos pulmonares se resuelven por completo.

Los cambios en la criptococosis pulmonar se agrupan en cuatro categorías dependiendo del tiempo de evolución de la infección, la virulencia de la cepa y del estado del huésped:

- El primer tipo es el más común con la aparición de un área de infiltración discreta, suele ser solitaria y se encuentra con frecuencia en el lóbulo superior. Se puede extender de forma gradual hacia la periferia y simular un carcinoma, absceso o quiste hidatídico. (Lehmann, 1984).
- En el segundo tipo se observa un infiltrado más amplio y difuso, que pueden convertirse en neumonías intersticiales bilaterales. (Fisher, 1977). La neumonía criptocócica suele ser una secuela de enfermedades virales ó neumocócicas. Puede quedar fibrosis residual después de la curación con un tratamiento adecuado.
- El tercer tipo se caracteriza por infiltrados peribronquiales extensos. Se asemeja a una tuberculosis activa, aunque la fibrosis suele ser mínima y la caseificación y cavitación es excepcional. (McDonnell, 1985).
- La forma más evolucionada es muy parecida a la tuberculosis miliar y suele presentarse en pacientes con linfoma o leucemia. Hay pequeñas lesiones en todos los campos pulmonares, y con el tiempo se puede formar granulomas. La enfermedad suele progresar y diseminarse. (Lozano, 1999).

La diseminación al sistema nervioso central (SNC) se puede presentar en cualquiera de estos tipos.

La criptococemia con aislamiento de criptococos en el hemocultivo representa la manifestación más clara de criptococosis diseminada y se asocia con un alto porcentaje de meningitis criptocócica. (Perfect, 1983).

Aunque *C. neoformans* no forma parte de la flora residente normal en el hombre, en el tracto respiratorio superior podría ser un colonizador transitorio.

6.2. CRIPTOCOCOSIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Es la forma clínica de criptococosis diagnosticada con mayor frecuencia, y la causa más común de muerte. La forma clínica más común es la meningitis, (Alonso, 1999) aunque también se puede producir una meningoencefalitis o un proceso expansivo pseudotumoral tipo criptococoma. (Perfect, 1983).

No se ha establecido con total claridad la razón por la cual *C. neoformans* tiene una afinidad tan grande sobre el SNC. Se cree que *C. neoformans* puede escapar del sistema inmunitario del huésped en el líquido cefalorraquídeo (LCR) ya que la fracción C3 del complemento no se fija sobre la levadura cosa que sí ocurre en el suero. (Kozel, 1984). Una alta concentración de glucosa puede inhibir la síntesis de la enzima fenoloxidasa, que se la asocia a la virulencia de *C. neoformans* (Polacheck, 1982). Por consiguiente la baja concentración de glucosa en el cerebro favorecería la síntesis de esta enzima por parte de la levadura. Esta enzima protege a *C. neoformans* contra ciertas sustancias oxidantes que suelen tener acción fungicida. (Wang, 1994, 1995).

En la meningitis criptocócica, el síntoma que se encuentra en casi todos los pacientes es una cefalea intensa. Estos pacientes presentan con menor frecuencia rigidez de nuca y signos de Kernig y de Brudzinski positivos que en la meningitis bacteriana. Puede haber trastornos de conciencia, y cambios de personalidad y otros trastornos psiquiátricos. (Dismukes, 1988, Levitz, 1991).

En los enfermos de SIDA con meningitis criptocócica el líquido cefalorraquídeo puede ser normal. El aspecto es claro, con hiperproteíorraquia variable y disminución de la glucosa. Puede observarse algunas células principalmente linfocitos. El número de criptococos es muy variable. La observación de las

levaduras capsuladas se realiza en el sedimento del líquido mezclado con tinta china. Algunas veces se han descrito cuadros de meningitis purulenta al hacer la punción raquídea, el recuento celular es elevado y con predominio de neutrófilos. (Kornfeld, 1979). En estos casos los pacientes suelen tener alguna anomalía como hepatitis activa crónica, enfermedad poliquística del riñón o enfermedad de Hodgkin. La identificación precisa sólo se puede hacer con el aislamiento e identificación del microorganismo.

La meningoencefalitis es una infección fulminante de curso muy rápido poco frecuente. (Everett, 1978). Produce coma profundo y muerte del paciente.

El criptococoma cerebral, puede producir signos de masa cerebral que se expande. Se presenta con náuseas, vómitos, cefaleas, diplopia y hemiparesias. Algunos pacientes sufren de somnolencia intermitente, o cambios de personalidad. Los trastornos mentales pueden ser importantes: irritabilidad, confusión, agitación, alucinaciones. (Thienhaus, 1984). Pueden sufrir incluso ataques epilépticos. Debido a la expansión del criptococoma, se producen hemiplejias y hemiparesias. Los criptococomas se diagnostican radiológicamente con la tomografía computarizada o por resonancia magnética nuclear.

Los polisacáridos criptocócicos aparecen en el líquido cefalorraquídeo en casos de infección. (Kovacs, 1985). Las pruebas serológicas para detectar anticuerpos no han sido efectivas ya que por una parte hay una pobre producción de anticuerpos durante la infección y también por la poca especificidad de las pruebas. Hasta ahora la prueba diagnóstica y pronóstica que se utiliza es la medición del antígeno capsular criptocócico en suero y LCR por técnica de aglutinación sobre partículas de látex impregnadas de antisuero de conejo hiperinmune o monoclonal.

La meningitis criptocócica sin un tratamiento rápido y adecuado es de evolución mortal.

C. neoformans var. *gattii* aparentemente tiene mayor tendencia a afectar

sujetos sanos y se podría considerar como un patógeno primario.(Chen, 2000, Mitchell D.H., 1995, López-Martínez, 1996). Se ha reportado ocasionalmente infección en pacientes inmunodeprimidos, incluidos aquellos con SIDA , y estos casos se han producido en zonas donde las dos variedades son endémicas, Australia, Brasil, México y Sur de California. (Rozenbaum, 1994, Speed, 1993, Castanon-Olivares 1997, Clancy 1990) aunque también se han comunicado casos en Canadá (St-Germain, 1988), Italia, (Montagna, 1997a) y un caso importado en Francia. (Dromer, 1992).

Asimismo, también se han descrito casos de criptococosis por la var. *gattii* en animales de sangre caliente, gatos (Malik, 1992), perros (Peluffo, 1976, Malik, 1995), caballos (Riley, 1992), koalas (Connolly, 1999), y en varios brotes epidémicos de criptococosis en cabras en España (Baró, 1998) que ha sido el resultado de una publicación para esta tesis.

Las infecciones debidas a *C. neoformans* var. *gattii* requieren de una terapia fúngica prolongada, y se las asocia con mayores secuelas neurológicas y con una mayor frecuencia de intervenciones neuroquirúrgicas que *C. neoformans* var. *neoformans*. (Mitchell, D.H., 1992, Speed, 1995). La respuesta terapéutica es más difícil seguramente debido a la presencia de criptococomas (Bava, 1990) o secuelas como la hidrocefalia. Algunos autores han publicado que no encuentran diferencias en la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos entre las dos variedades. (Mitchell, D.H., 1995, Chen, 2000).

6.3. CRIPTOCOCOSIS CUTÁNEA

El primer caso de criptococosis con localización cutánea fue descrita por Busse y Buschke en 1894, en un hombre con lesiones en la piel, infección ósea, y enfermedad generalizada.

Estas lesiones suelen ser manifestaciones de enfermedad diseminada en pacientes con inmunodepresión y ocurren en un 10% de los casos. (Hernandez, 1989). Las lesiones de la piel son por lo general múltiples y se presentan en forma de pápula, pústulas, vesículas o abscesos que con el

tiempo se ulceran. (Durdan, 1994). Pueden presentar forma de lesiones trombóticas profundas, ó con aspecto de celulitis. (Jimenez-Lucho, 1985). Las lesiones que tienen aspecto de molusco contagioso y que se distribuyen por cara y cuello, se observan principalmente en pacientes con SIDA. (Mitchell T.G., 1995).

También puede presentarse esta infección micótica como una lesión primaria (Baes, 1985). aunque es muy poco frecuente. (Vogelaers,1997). Este autor describe un caso en Bélgica, en un hombre criador de palomas con una terapia con corticosteroides por una enfermedad obstructiva crónica.

La lesión suele ser única y superficial. Las defensas inmunitarias del huésped son normales, no se detectan antígenos solubles circulantes en sangre y se suele aislar con mayor frecuencia la var. neoformans serotipo D. (Dromer, 1996a). Las lesiones primarias se pueden resolver de forma espontánea, ó con la administración de anfotericina B para evitar la infección diseminada.

Las lesiones cutáneas causadas por *C. neoformans* var. *gattii* son muy raras aunque hay algún caso descrito. Ridell (1969) y Severo (2001) describen una criptococosis cutánea después de sufrir una infección diseminada y Hamann (1997) una infección cutánea primaria. Estos pacientes vivían en zonas como Australia y Brasil donde *C. neoformans* var. *gattii* es un importante patógeno.

Otras localizaciones de la criptococosis son la ósea, tracto genital y urinario. Se ha propuesto que el papel de la próstata es importante en el proceso de mantenimiento de la infección. (Larsen, 1989). Después del tratamiento correcto de una meningitis criptocócica curada clínicamente se observan recaídas. En estos casos parece ser que la próstata actúa como reservorio de las levaduras y da origen a reinfecciones. (Bozzette, 1991).

7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la criptococosis se basa en poner en evidencia a la levadura por examen directo, estudio histológico, aislamiento por cultivo del

hongo, o por pruebas serológicas que permiten la búsqueda de antígenos en los líquidos biológicos.

7.1. EXAMEN DIRECTO

El examen directo en fresco se realiza rutinariamente utilizando tinta china. Se mezcla una gota del sedimento del líquido cefalorraquídeo con una gota de tinta china, y la levadura aparece sobre un fondo oscuro envuelta de una zona no teñida que es la cápsula. Su tamaño es variable y puede tener un diámetro doble o triple del de la célula. (Figura 2).

7.2. EXAMEN HISTOLÓGICO

En el examen histológico se observa la presencia de levaduras capsuladas. Para ello se utilizan una serie de tinciones como la de plata-metenamina (Grocott-Gomori) que tiñe la pared de las levaduras y el mucicarmín de Mayer que tiñe la cápsula de color rosado.

Se pueden presentar dos patrones histológicos principales, uno gelatinoso y otro granulomatoso. Ambos tipos pueden coexistir en la lesión. El número de levaduras en las lesiones granulomatosas es menor que en las de tipo gelatinoso. En estas últimas las levaduras se encuentran en su mayoría libres en los tejidos, mientras que en las lesiones granulomatosas, casi todas se encuentran dentro de células gigantes e histiocitos. Estas muestras son de difícil obtención ya que hay que realizar biopsias, que son muestras normalmente cruentas.

7.3. DETECCIÓN ANTÍGENOS SOLUBLES

La detección de antígenos solubles que son liberados durante el curso de una criptococosis se realiza por una prueba de aglutinación que reacciona con los antígenos capsulares presentes en los líquidos biológicos

(Goodman, 1971, Chapin-Robertson, 1993, Piens, 1996). Las partículas de látex o de nitrocelulosa son sensibilizadas con anticuerpos anticriptocócicos. En los pacientes con SIDA los títulos de antígeno criptocócico en suero ó LCR pueden llegar a ser muy elevados. (Miró, 1997) y tener todos los cultivos negativos. (Mitchell T.G., 1995). A partir de una dilución $\geq 1/16$ debe sospecharse de una criptococosis. La detección del antígeno en suero y LCR tiene una gran importancia diagnóstica, pero para la monitorización del curso de la enfermedad debe realizarse esta detección en la muestra del LCR ya que, un aumento en dos o más diluciones durante el tratamiento de mantenimiento hace sospechar que se va a producir una recidiva. (Powderly, 1994, Miró, 1997, García de Olalla, 1999). Actualmente existen equipos comerciales que permiten inactivar el factor reumatoideo, que puede ser causa de falsos positivos. También se han descrito falsos positivos en infecciones por *Trichosporon beigeli*, *Capnocytophaga canimorsus*, en la sífilis terciaria, la histoplasmosis y en la mucormucosis. También se pueden dar falsos negativos a causa del fenómeno de prozona, y en este caso hay que diluir la muestra o tratarla enzimáticamente con pronasa.

7.4. CULTIVO

El aislamiento de la levadura por cultivo de sangre y líquido cefalorraquídeo se realiza por cultivo preferencial en el medio de agar de Sabouraud al que se le ha añadido antibacterianos como el cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias. No se puede usar cicloheximida (Actidiona) ya que los criptococos se inhiben en su presencia. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque también crecen a 25°C. Sin embargo *C. neoformans* se desarrolla bien en medios bacteriológicos generales como agar sangre, Ruiz Castañeda y medios líquidos para hemocultivos.

Para las muestras con gran número de contaminantes, como por ejemplo muestras respiratorias o muestras ambientales se usan medios especiales selectivos y diferenciales como son el medio de *Guizotia abyssinica* (Staub, 1962a y 1966, Shields, 1966), con ácido cafeico ó el medio de Pal que usa

un extracto acuoso de semillas de girasol (*Helianthus annuus*). En estos medios, *Cryptococcus neoformans* es capaz de sintetizar la enzima fenoloxidasas que cataliza la oxidación de unos sustratos difenólicos en productos similares a la melanina (McFadden, 2001). Estos sustratos hacen que las colonias queden de un color pardo que permite diferenciarlas de otras levaduras como las cándidas u otras especies de criptococos como *Cryptococcus laurentii*.

7.5. IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA

La identificación específica de *C. neoformans* requiere de estudios fisiológicos como son el crecimiento a 37°C, y pruebas de asimilación y utilización de azúcares como el inositol, la asimilación de la creatinina, y la producción de ureasa, (Zimmer, 1979) antes de 15 min mientras que otras especies de levaduras ureasa positivas tardan mucho más tiempo en producirla. Se han descrito algunas excepciones, de *C. neoformans* que no producen ureasa. (Ruane 1988, Bava, 1993).

Una vez identificada la especie, para discriminar entre las dos biovariedades de *C. neoformans* se utiliza el medio “canavanina-glicina-azul de bromotimol” (Kwon-Chung, 1982), ya que la var. *gattii* asimila la glicina y es resistente a la L-canavanina. Al utilizar la glicina se alcaliniza el medio y se produce un cambio de color que se detecta por el indicador azul de bromotimol. Como ya hemos explicado también se puede identificar la var. *gattii* mediante la prueba de asimilación de la D-prolina, (Dufait, 1987) y D-triptófano (Mukamurangwa, 1995) ya que la var. *neoformans* no puede usar estos aminoácidos como fuente de nitrógeno.

El estudio del serotipado de las cepas se realiza con anticuerpos policlonales que permiten diferenciar los diferentes serotipos de las cepas de *Cryptococcus*. (Evans, 1950 y 1951, Wilson 1968, Ikeda 1982).

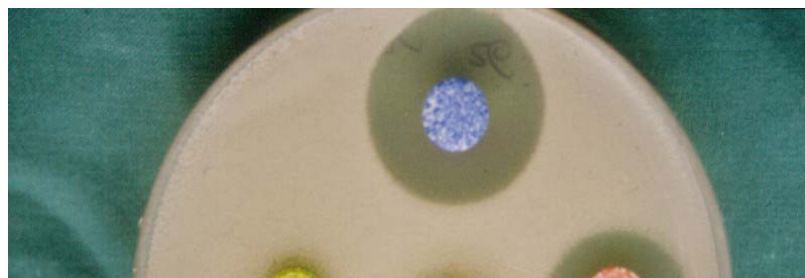
Actualmente han aparecido trabajos cuya base es la biología molecular mediante los cuales se intenta detectar antígenos criptocócicos de muestras clínicas de pulmón o de LCR. (Rappelli, 1998).

También son necesarios los métodos de biología molecular para caracterizar genéticamente a los hongos, ver la incidencia de una cepa dentro de una población, tratar de hallar el origen de una infección, comprobar si hay reinfección o recidiva después de varios aislamientos en un mismo paciente de una determinada cepa, para la vigilancia de la aparición de cepas resistentes a antifúngicos. Hay que disponer de técnicas de biología molecular para establecer semejanzas genéticas entre las cepas. (Varma,1992) con buen poder discriminatorio y cuyos resultados sean reproducibles. (Polacheck, 1992, Spitzer, 1992).

8. SENSIBILIDAD *IN VITRO* A LOS ANTIFÚNGICOS

Se han descrito diversos métodos para conocer la sensibilidad *in vitro* de *C. neoformans* a los antifúngicos usados en el tratamiento de la criptococosis, entre ellos como es el método de difusión en agar que se basa en el mismo procedimiento que el antibiograma por el método de Kirby Bauer para bacterias, pero plantea problemas con los agentes no hidrosolubles como la anfotericina y es de difícil estandarización.

Figura 8: Sensibilidad de *Cryptococcus neoformans* mediante la técnica de difusión en agar por el sistema "Neo sensitabs".



Actualmente existe el acuerdo de que la sensibilidad antifúngica se debe realizar mediante el estudio de las concentraciones inhibitorias mínimas, por microdilución, siguiendo métodos estandarizados como los propuestos en EEUU por el “National Committee for Clinical Standards (NCCLS) (documento M27-A, 1997). Numerosos investigadores han trabajado para estandarizar los métodos de estudio de la sensibilidad para los hongos. (Espinel-Ingroff, 1996a, Pfaller, 1995 y 1997) y se ha llegado a un consenso básico para aplicarlo a *C. neoformans*.

Existen métodos comerciales basados en la técnica de microdilución del NCCLS con paneles preparados con antifúngicos y un indicador de crecimiento (azul Alamar) que permiten la detección de cepas resistentes y que pueden facilitar la lectura mediante cambio de color. (Pfaller, 1994a, 1994b, Tiballi, 1995, Davey, 1998, Swinne, 1999, López-Jodra, 2000).

El sistema Etest[®] es un método cuantitativo de difusión en agar basado en unas tiras impregnadas en gradiente de concentración de antifúngicos. (Colombo, 1995, Espinel-Ingroff, 1996b). Su correlación con el método de la NCCLS varía según los estudios y depende de varios factores, como son los medios de cultivo, tiempo de incubación, y sobre todo la interpretación de la lectura de los halos que producen los compuestos azólicos. (Martín, 1999).

Hay muy pocos estudios que correlacionen los resultados obtenidos *in vitro* con la respuesta terapéutica *in vivo*. Se acepta que una cepa sensible *in vitro* no es suficiente para predecir el éxito terapéutico, pero un valor alto de CIM a un determinado antifúngico puede predecir un fallo terapéutico. (Witt, 1996, Espinel-Ingroff, 2000).

9. TRATAMIENTO

Hasta principios de la década de 1950 no existía ningún tratamiento efectivo para la criptococosis, y la mortalidad era casi del 100%.

En 1951 el descubrimiento de los polienos, y en concreto en 1956 de la anfotericina B (AMB) ha permitido el tratamiento eficaz de las infecciones sistémicas y las meningitis criptocócicas. Su mecanismo de acción se basa en la capacidad de unión al ergosterol de la membrana con formación de poros que hacen que se pierda la integridad de la membrana celular seguida de una fuerte permeabilidad y pérdida de sustancias como el potasio, con la consiguiente muerte celular.

En 1964 se demostró que la 5-fluorocitosina (FC) tenía actividad antifúngica, y que podía usarse de forma oral para el tratamiento de la criptococosis. Sin embargo la aparición de resistencias en cepas de *Candida albicans* en el curso de la monoterapia limitó su uso. En 1979, Bennett demostró por primera vez el efecto sinérgico de la asociación de anfotericina B y 5-fluorocitosina. Esta asociación parece ser que además reduce la toxicidad renal de la AMB.

La aparición de los compuestos azólicos en 1970, supuso un gran avance para el tratamiento de las infecciones fúngicas. Los imidazoles son moléculas de primera generación. Sólo miconazol y ketoconazol se han utilizado para infecciones sistémicas, pero con muy limitado efecto en *C. neoformans*.

Los triazoles son los azoles de segunda generación, y son de gran utilidad en el tratamiento de la criptococosis. Fluconazol e itraconazol se han mostrado eficaces en el tratamiento de este tipo de micosis y tienen menos efectos secundarios que la anfotericina B. Sin embargo su efectividad es menor que la de anfotericina B en los enfermos con SIDA o con un alto grado de inmunodepresión.

9.1. Anfotericina B

Es una molécula que se administra por vía endovenosa en dilución con suero glucosado. Es el tratamiento de elección, ya que tiene actividad fungicida, y a pesar de que no atraviesa bien la barrera hematoencefálica es eficaz en la criptococosis. Tiene el inconveniente de su gran toxicidad, con muchos efectos secundarios, el principal es la nefrotoxicidad, con aumento de los niveles de creatinina. También puede producir fiebre, escalofríos, hipotensión y shock. En algunos casos se puede observar anemia, y trombocitopenia.

Se ha intentado reducir su toxicidad incorporando la molécula a cápsulas formadas por liposomas o asociándola otras sustancias lipídicas. Hay trabajos que comparan el tratamiento tradicional con anfotericina B y las nuevas formulaciones lipídicas. (complejo lipídico, dispersión coloidal, liposomal). Las dosis se pueden elevar con una buena tolerancia. (Viviani, 1994, Perfect, 1994, Hiemenz, 1996, Diamond, 1998) sin embargo el elevado precio de las formulaciones lipídicas limitan su uso.

9.2. 5-Fluorocitosina

Es una molécula derivada de las pirimidinas fluoradas Es un molécula hidrosoluble. Tiene poca toxicidad cuando es administrada a los pacientes

aunque puede haber toxicidad hematológica con leucopenia y trombocitopenia y toxicidad hepática. Es activa frente a las levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*, pero se ha publicado la aparición de cepas de *Candida* resistentes cuando se emplea como monoterapia. Se administra por vía oral ó i/v con amplia difusión en LCR y orina.

Se la asocia generalmente con anfotericina B para el tratamiento de las meningitis criptocócicas disminuyendo la dosis de ambos fármacos. (Bennett,1979). También se han probado otras asociaciones como son con fluconazol (Nguyen, 1995) o itraconazol (Barchiesi, 1999), pero los resultados no son definitivos.

9.3. Triazoles

Ejercen su actividad inhibiendo la síntesis del ergosterol. El fluconazol e itraconazol se pueden administrar de forma oral, pero fluconazol al ser hidrosoluble se puede administrar también de forma intravenosa. Actualmente también existen preparados de itraconazol que se pueden administrar por vía i/v. El fluconazol difunde bien al LCR unido a las proteínas séricas (Witt, 1996). Se elimina principalmente por vía renal. Se debe reducir la dosis cuando hay insuficiencia renal.

Itraconazol es una molécula lipófila e insoluble en agua. Se une fuertemente a las proteínas plasmáticas y difunde pobremente al LCR, orina y otros líquidos biológicos, pero se acumula en tejidos adiposos como en el SNC. A pesar de esta pobre difusión, se ha usado como tratamiento en las meningitis criptocócicas. (Viviani,1990, Cauwenberg, 1993).

Suele haber una buena tolerancia en el curso del tratamiento con los triazoles.

No hay un tratamiento consensuado para la criptococosis. (Larsen,1990, Saag, 1992, Taborda, 1993). El tratamiento de los pacientes con criptococosis

y SIDA en general consiste en empezar con anfotericina B (0.7 mg/kg/d) asociada o no con 5-fluorocitosina (100 mg/kg/d) durante 2 semanas seguida de fluconazol o itraconazol a dosis de 400 mg/d unos 2 meses y 200 mg/d como dosis de mantenimiento de por vida. (Alonso, 1999, Saag, 2000).

La criptococosis meníngea sin tratamiento suele ser mortal en un elevado número de casos (Powderly, 1993, Dromer, 1996b), por lo tanto la eficacia del tratamiento dependerá de la gravedad de los síntomas y del estado inmunitario del paciente.

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La criptococosis es una infección fúngica producida por el anamorfo *Cryptococcus neoformans* del basidiomiceto *Filobasidiella neoformans*. Esta micosis se presenta principalmente como oportunista afectando a enfermos inmunosuprimidos y entre ellos sobre todo a los pacientes VIH positivos.

Este hongo es el responsable de la muerte de enfermos de sida no controlados en todo el mundo, y llegó a infectar en los años previos al tratamiento retroviral de alta actividad entre el 5 y el 10 % de los enfermos VIH positivos en EEUU.

En España se dispone de muy poca información sobre la incidencia y prevalencia de esta levadura en nuestro medio ambiente y de la prevalencia de las diferentes biovariedades de esta levadura. Asimismo existe una carencia total de datos sobre la distribución de los diferentes serotipos de *Cryptococcus neoformans* en el área geográfica del estado español. Tampoco existen estudios amplios que investiguen la sensibilidad a los antifúngicos sistémicos disponibles que tienen actividad sobre *Cryptococcus neoformans*.

En el Laboratori de Micologia del Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), tiene una larga tradición de investigación en enfermedades fúngicas. En particular de candidosis, (Alía, 1986, Rosés,1983, Torres-Rodríguez 1985, 1989, 1991), aspergilosis (Madrenys, tesis 1996, Torres-Rodríguez, 1992 y 1993). Asimismo en el Hospital del Mar se diagnosticó en 1986 (Torres-Rodríguez, 1986) el primer caso de criptococosis en un enfermo de SIDA. En el Servicio de Enfermedades Infecciosas de este centro se ha recopilado una amplia serie de casos de criptococosis y se consideró de gran interés conocer más datos sobre su agente etiológico. De ahí se planteó la necesidad de conocimientos más profundos de la criptococosis en España.

En el país, existe una elevada tasa de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), aunque desde la introducción en 1997 de los los tratamientos antirretrovirales de gran actividad (TARGA), (Berenguer, 1998, Viciano, 1998, García de Olalla 1999) se ha producido un cambio sustancial en las infecciones oportunistas en enfermos de SIDA. Como consecuencia de ello también ha disminuido significativamente la incidencia de la criptococosis. Sin embargo a pesar de estos tratamientos, se continúan presentando casos de criptococosis y esta infección sigue teniendo un elevado índice de mortalidad o de secuelas graves en los pacientes afectados.

Por estas razones toda contribución a esclarecer cual es la ecología de *Cryptococcus neoformans* y la epidemiología de la criptococosis representa un aporte de interés para conocer la importancia de esta micosis en nuestro medio.

III. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo principal del proyecto de esta tesis es disponer de datos para conocer la epidemiología de la criptococosis en España.

Para ello se ha establecido el desarrollo de las siguientes etapas:

1- Se realizará una recopilación de un número elevado de cepas de *Cryptococcus neoformans* de diferentes hospitales de España y se registrarán los datos clínicos de los pacientes.

En el caso de que se tuvieran aislamientos de *Cryptococcus neoformans* de animales que hubieran sufrido criptococosis se procederá también a su estudio.

2- Para conocer la incidencia de esta levadura en nuestro entorno se tomarán muestras del medio ambiente. Para ello se intentará aislar este hongo de muestras de polvo doméstico de los enfermos con criptococosis, del domicilio de los pacientes VIH positivos sin antecedentes de infección criptocócica y también del domicilio de personas sanas, con el fin de comprobar si el polvo doméstico puede ser un reservorio de *C. neoformans* en nuestro medio.

3- Se pondrán a punto las técnicas que permitan el estudio de la biovariedad de los aislados de *C. neoformans* obtenidos en nuestra área geográfica. Se quiere conocer si en España coexiste *C. neoformans* var. *neoformans*, con *C. neoformans* var. *gattii* a pesar de que en la literatura científica esta última variedad está muy restringida a determinadas áreas geográficas del mundo.

4- Para poder realizar el estudio del serotipado de un número elevado de cepas aisladas de diferentes regiones de España, se procederá a la obtención de suero específico, en nuestro laboratorio, que permita distinguir los diferentes serotipos de *C. neoformans* (A, B, C y D). Mediante el uso de dichos anticuerpos policlonales se procederá al tipaje serológico de las cepas de *C. neoformans* tanto las de origen saprófito como las de

origen clínico. Para ello se procederá a la inmunización de conejos “New Zealand White” con las cepas patrón de cada serotipo y se realizará una posterior absorción con células heterólogas del suero obtenido. Se usará como control de calidad un equipo comercial “Crypto Check” agglutination test (Iatron Labs Inc., Tokyo, Japan) para comparar los dos métodos .

En el caso de que se obtuvieran cepas de *C. neoformans* de otros países se procederá a realizar el serotipado de dichas cepas para comparar los resultados obtenidos de los diferentes orígenes.

- 5-** Se procederá a la determinación de la sensibilidad *in vitro* de todas las cepas de *C. neoformans* a los principales antifúngicos sistémicos usados en el tratamiento de esta micosis para conocer el nivel de sensibilidad de las diferentes cepas.

Para ello se determinarán las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) siguiendo las recomendaciones dadas por el National Committee for Clinical Standards (NCCLS) (documento M27A). Se valorará si hay diferencias según el origen de los aislamientos y los diferentes serotipos.

- 6-** Para la valoración de la eficacia y reproductibilidad de un sistema colorimétrico comercial y su posible inclusión como rutina en los laboratorios clínicos se realizará un estudio comparativo con el método estandar con determinadas cepas *C. neoformans*.

- 7-** Para conocer la actividad de nuevos antifúngicos frente a *C. neoformans* se realizará un estudio *in vitro* que permita conocer la efectividad de las nuevas moléculas .

- 8-** Se procederá a la caracterización mediante análisis molecular de grupos seleccionados de cepas de *C. neoformans*. Para ello se pondrá a punto una técnica de “Random Amplification of Polymorphic DNA” (RAPD). Con ello se pretende conocer si las cepas de un posible brote epidémico puedan tener un origen común. También sería interesante conocer si los diferentes aislamientos obtenidos en el tiempo de un mismo paciente puedan corresponder a una misma o una cepa diferente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJETIVO 1

1. Cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas en España

El número de aislamientos de *Cryptococcus neoformans* recopilados para este estudio pertenecientes a diferentes áreas geográficas de España ha sido de 184 cepas y abarcan un período de 10 años, desde 1988 hasta 1997.

1.1. Cepas de origen clínico humano

En 1997 se efectuó una encuesta exhaustiva en diferentes Centros donde cabía la posibilidad de que se hubieran atendido pacientes con criptococosis, y se intentó recabar información sobre los datos clínicos. Se solicitó el envío de las cepas de *Cryptococcus neoformans* que se hubieran obtenido.

Lamentablemente muchos Centros confirmaron el aislamiento de cepas de *Cryptococcus neoformans*, pero no así la conservación de las cepas.

El total de aislados de muestras clínicas humanas ha sido de 128 cepas, a partir de 115 pacientes. Varios de estos pacientes tenían más de un aislamiento en el tiempo.

Tabla 1: Distribución de las cepas de origen clínico aisladas de pacientes

de diferentes regiones geográficas de España.

Región geográfica	Nº pacientes	Nº cepas
Barcelona	35	36
Valencia	11	11
Mallorca	21	21
Sevilla	20	32
Madrid	17	17
Salamanca	1	1
País Vasco	9	9
Santander	1	1
Total	115	128

Se obtuvieron datos clínicos en el 80% de los casos de los cuales, el 95% correspondieron a pacientes infectados por el virus VIH, y tenían como antecedentes el ser adictos a drogas por vía parenteral, excepto en un paciente hemofílico, y en un paciente homosexual.

El 5% restante eran pacientes no infectados por le VIH, y se trataba de personas transplantadas, con tratamiento inmunosupresor, así como pacientes con enfermedades hematológicas y tumores sólidos, pacientes, todos ellos inmunodeprimidos.

El 58 % de los aislamientos se obtuvieron por cultivo de líquido cefalorraquídeo, y un 35% de muestras de sangre. El resto incluía muestras varias como orina, líquido pleural, broncoaspirado.

1.2. Cepas de origen clínico animal

La obtención de muestras de origen animal fué muy difícil ya que las cepas no eran conservadas en la gran mayoría de laboratorios veterinarios. Sin embargo se pudo incluir 13 cepas de *C. neoformans* cultivadas a partir de muestras de tejido que se habían obtenido por autopsia de 6 cabras pertenecientes a 5 rebaños de diferentes áreas de la provincia de Cáceres.

Estos animales sufrían de neumonía subaguda ó crónica asociada a disnea, y caquexia. Además de los síntomas severos respiratorios en algunos casos también tenían signos neurológicos.

1.3. Cepas ambientales

Se procesaron para su estudio cuarenta y tres aislamientos de muestras de heces de paloma pertenecientes a 3 regiones geográficas, 23 cepas de Alicante, 10 cepas de Barcelona y 10 de Córdoba.

2. Aislados de *Cryptococcus neoformans* procedentes de América Central y del Sur

Se remitieron a nuestro laboratorio para su estudio, 110 cepas de tres países de Centroamérica y Sudamérica. Cuarenta y cuatro cepas eran aislamientos clínicos de Argentina aisladas en Buenos Aires, 44 cepas provenían de tres regiones de Brasil y 22 cepas de Cuba. Todos los aislados eran de pacientes humanos excepto una cepa de Cuba que pertenecía a una muestra de necropsia de un felino, una cheeta (*Acinonyx jubatus*) muerta de criptococosis en el Zoológico de la Habana, Cuba.

Tabla 2: Distribución de las cepas americanas según su origen geográfico.

País	Nº pacientes	Nº cepas
Argentina	44	44
Brasil		44
Porto Alegre	8	
Curitiba	8	
Río de Janeiro	28	
Cuba	22	22
Total	110	110

OBJETIVO 2

Conocer la prevalencia de *Cryptococcus neoformans* en muestras de polvo doméstico.

Carta al Director:

Artículo: Estudio de muestras de polvo doméstico para el aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans*.

Revista Iberoamericana de Micología 1998;15:309.

El estudio de las muestras ambientales de polvo doméstico para comprobar la incidencia de esta levadura en nuestro medio ambiente y si podía ser una posible fuente de infección para los pacientes con VIH (+), no ha dado resultados similares a los trabajos realizados previamente por Emmons (1951), que aisló 4 cepas de *C. neoformans* a partir de muestras de tierra en Virginia, Maryland y posteriormente por Swinne en Burundi (1989) y Kinshasa (1986) con un 40 % de positividad (2/5 casas de pacientes con infección criptocócica y SIDA) y Lázera (1993) y Passoni en Brasil (1998) con un 15.6 % de 32 casas de pacientes con infección criptocócica y SIDA .

En nuestro intento por aislar *C. neoformans* se han estudiado un total de 79 domicilios, de los cuales 6 eran de personas con SIDA y que sufrían criptococosis en el momento de la obtención de las muestras y otros 11 domicilios de pacientes VIH positivos sin criptococosis que estaban siendo controlados en el Centro de día del Hospital del Mar. El resto eran muestras domiciliarias de personas sanas que se utilizaron como controles.

Es de remarcar la gran dificultad en la obtención de las muestras en la

mayoría de pacientes VIH positivos, debido al desarraigo social que la gran mayoría de ellos sufren. Un porcentaje elevado no solían regresar para el seguimiento de su tratamiento lo que implicaba la imposibilidad de obtención de muestras de su domicilio. Es por ello, que ha sido gracias a nuestra propia insistencia y sobretodo a la concienciación por parte del Servicio de Infecciosas, en particular del Dr Gimeno y Dr Saballs y de la Sta Pilar Colomer Mon, enfermera del Centro de día del Hospital del Mar que se han podido obtener este tipo de muestras.

Se pusieron a punto las técnicas para el aislamiento de *C. neoformans* a partir de muestras de polvo. Para ello se usó la técnica descrita por Làzera y col. en el Laboratorio de Micología de Río de Janeiro, Brasil que tiene una gran experiencia en el cultivo de este hongo de muestras ambientales, incluyendo el polvo. (Làzera,1993).

– **Estudio del umbral de detección y control de calidad de la técnica**

Para conocer el umbral de detección del método se realizó una suspensión con una asa de un cultivo de 24 h de *C. neoformans* en un tubo con 10 ml de suero salino estéril.

Se realizaron diluciones decimales seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-6} sembrando a partir de cada suspensión 100 μ l por duplicado en una placa con extracto de semillas de *Guizotia abyssinica* (GA) y una placa con extracto de semillas de girasol (SF).

Se incubaron durante 1 sem con inspección diaria a 25 °C.

Se observó crecimiento a las 48h-72h. de las colonias pigmentadas hasta la dilución 10^{-5} con una media de crecimiento de 10 colonias, por lo que el umbral de detección de la técnica se puede considerar que es 10^2 col/ml.

Tabla 1: Recuento de colonias de *Cryptococcus neoformans* según dilución

y medio de cultivo empleado, *Guizotia abyssinica* (GA) y semillas de girasol (SF).

Dilución	medio GA		medio SF	
	1	2	1	2
10^{-1}	Incont	Incont	Incont	Incont
10^{-2}	Incont	Incont	Incont	Incont
10^{-3}	Incont	Incont	Incont	Incont
10^{-4}	102	111	99	103
10^{-5}	10	12	9	10
10^{-6}	0	0	0	0

– Técnica de cultivo

Se recogieron las muestras de polvo domiciliario en contenedores estériles de diferentes áreas del domicilio.

A partir de una suspensión de 0.05 g de polvo en 15 ml. de suero fisiológico con 0.3 g/l de cloranfenicol se sembraron dos placas de Petri con dos medios diferenciales, el medio de *Guizotia abyssinica* que contiene un extracto de semillas de negrito y el medio de *Helianthus annuus* con extracto de semillas de girasol. Estos medios permiten diferenciar las colonias de color amarronado, debido a la acción de la fenoloxidasa de *C. neoformans*, de otras levaduras. Las placas se incubaron durante una semana con inspección diaria para el cultivo e identificación de las colonias sospechosas.

- Controles

Se realizó un control de calidad de la técnica con una muestra de polvo positiva remitida por la Dra Làzera desde Brasil como control externo y una muestra de polvo en la que se habían añadido 10 µl de una suspensión en solución salina de *C. neoformans* a una concentración de 3×10^6 UFC/ ml como control interno.

En los dos casos y siguiendo la técnica descrita se aislaron colonias de *C. neoformans*.

Resultados

En los cultivos de las muestra de polvo de casos no se logró aislar *C. neoformans*. Se cultivaron otras especies de *Cryptococcus* consideradas como no patógenas. En tres muestras de polvo se aisló *Cryptococcus laurentii* y en una *Cryptococcus albidus* todas ellas de domicilios de personas sanas.

Se aislaron también otras levaduras de las muestras de polvo domiciliario.

Tabla 2: Levaduras aisladas en las muestras de polvo domiciliario.

Levaduras	Muestras	Cripto/Sida	VIH+	Control
<i>Candida famata</i>	2	-	-	2
<i>Candida zeylanoides</i>	4	-	-	4
<i>Candida lipolytica</i>	1	-	1	-
<i>Candida sp</i>	13	-	-	13
<i>Rhodotorula sp</i>	8	2	1	5
<i>Aureobasidium sp</i>	1	-	1	-

Estos resultados permiten afirmar que, al no haber aislado *C. neoformans* de las muestras estudiadas, el polvo doméstico no parece ser un reservorio

de importancia para la transmisión de la criptococosis en nuestro medio ambiente.

A diferencia de los estudios realizados por Swinne, (1986) en países tropicales africanos en los que encuentra esta levadura en dos muestras de polvo doméstico de los cinco domicilios de pacientes que sufrían de criptococosis y en 3 de 74 muestras de otros casas, Swinne sugiere que las muestras ambientales en las que se aísla *C. neoformans* con mayor frecuencia son las que incluyen heces de paloma, (Swinne, 1975,), ya que se ha comprobado que son un buen sustrato para el crecimiento de *C. neoformans*. (Walter, 1968). En ambientes con acúmulos de excretas y sobre todo cerrados, por movimientos de aire, se puede contaminar el polvo ambiental. (Powell,1972, Neilson, 1977, Ruiz, 1981),

En vista de que el reservorio saprofítico de *C. neoformans* en nuestro medio ambiente no parece ser el polvo doméstico, se inició un estudio ambiental de muestras de heces de paloma de diferentes zonas de la ciudad de Barcelona, sobre todo del Barrio Gótico que debido a la abundancia de palomas y sobre todo por las características arquitectónicas de la zona con poca iluminación solar hacían óptimo el desarrollo de *C. neoformans* . Hasta el momento se han procesado 50 muestras de excretas obteniéndose una positividad del 20 %, para *C. neoformans*. (Pendiente de publicación)

OBJETIVO 3

Averiguar si en España existen cepas autóctonas de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.

Artículo I: First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain.

Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36:458-461.

En este artículo original, se demuestra por primera vez, la presencia en nuestro país de la variedad *gattii* de *Cryptococcus neoformans*.

Durante 1990 a 1994 se produjeron 5 brotes de criptococosis en cabras (*Capra hircus*) de diferentes razas (*verata*, *serrana*, y *murciana*) en diferentes zonas de pastoreo de la provincia de Cáceres y que cursaron con un alto porcentaje de animales clínicamente afectados y una mortalidad del 100% .

Estos episodios fueron diagnosticados, seguidos y estudiados en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura por el Dr Miguel Hermoso de Mendoza, quién se encargó de realizar las necropsias de los animales muertos y el cultivo de las lesiones, aislando y conservando las cepas identificadas como *C neoformans* y que seguidamente fueron tipadas en este estudio.

Todos los animales afectados sufrían de síntomas respiratorios severos asociados a caquexia, y en algunos casos síntomas neurológicos.

Tabla 1:

**CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES BROTES DE
CRIPTOCOCOSIS POR *C.neoformans* var.*gattii* EN
CABRAS EN LA PROVINCIA DE CÁCERES.**

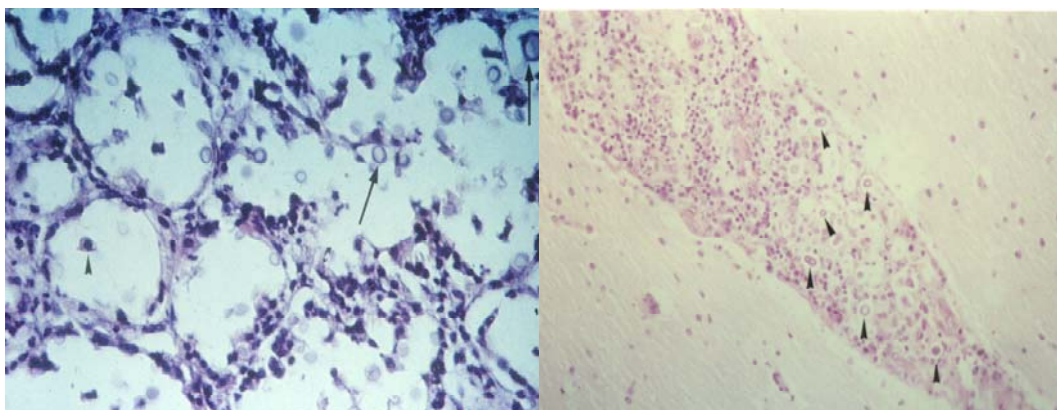
Período del brote	Animales por rebaño	Prevalencia clínica %	Necropsia Nº de animales	Aislamiento <i>Cryptococcus</i>
1990	140	12	2	5
1991	250	2	1	2
1994	300	10	1	2
1994	200	?	1	2
1994	120	2.5	1	2

Todos los animales infectados presentaban congestión de la mucosa nasal, tos, disnea, anorexia asociada a una grave desnutrición, y en algunos casos también tenían signos neurológicos, como ataxia, midriasis, ceguera y parálisis progresiva. El curso de la enfermedad fue en todos los casos la muerte del animal.



En el estudio de las diferentes muestras histopatológicas de pulmón y cerebro se observó la presencia de levaduras con un halo alrededor correspondiente a la cápsula.

Figura 1: Examen histopatológico de pulmón y cerebelo de autopsia de cabra con un alto número de levaduras capsuladas. Tinción de hematoxilina-eosina. (400X y 200X). Fotografía: M. Hermoso de Mendoza.



Los 6 animales en los que se realizó la autopsia originaron cultivos positivos de *C. neoformans*. En todos resultaron positivas por lo menos dos muestras tomadas de diferentes localizaciones, lo que confirma la diseminación de la micosis. En total se aislaron 13 cepas, 10 de muestras de pulmón, dos de cerebro y una de hígado. Dos cabras pertenecían al mismo rebaño (1990).

Estas cepas fueron guardadas en la colección del Departamento de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura y nos fueron remitidas por el Dr M.Hermoso de Mendoza para su estudio.

Se procedió primeramente a cultivarlas en medios con extracto de “negrito” (*Guizotia abyssinica*) y extracto de semillas de girasol (*Helianthus annuus*), para la obtención de cultivo puro de cada cepa, y verificar la producción de la enzima fenoloxidasa por observación de colonias de color marrón.

Se realizó la prueba de la ureasa a los aislados siendo todos ellos positivos.

Se procedió al estudio auxonográfico de azúcares y a la comprobación de la sensibilidad a la cicloheximida, por medio del sistema Auxocolor (Sanofi, Pasteur, Paris, Francia), resultando todas las pruebas características de *C. neoformans*.

Las 13 cepas aisladas de necropsia de las 6 cabras, fueron procesadas para conocer la biovariedad a la que pertenecían, mediante el crecimiento en medio específico de L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (Kwon-Chung, 1982), y el estudio de la asimilación de D-prolina (Dufait, 1987) y D-triptófano, (Mukamurangwa, 1995).

Las 13 cepas crecieron en el medio de CGB ocasionando el viraje del medio de amarillo dorado a un azul intenso, propiedad de la variedad *gattii*. Así mismo se comprobó que todas ellas crecían alrededor del disco impregnado de D-prolina y D-triptófano. Los controles con cepas de las variedades *neoformans* y *gattii* dieron correctos.

Figura 2: Crecimiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* alrededor de los discos de D-prolina y D-triptófano sobre medio de yeast-carbon-base.

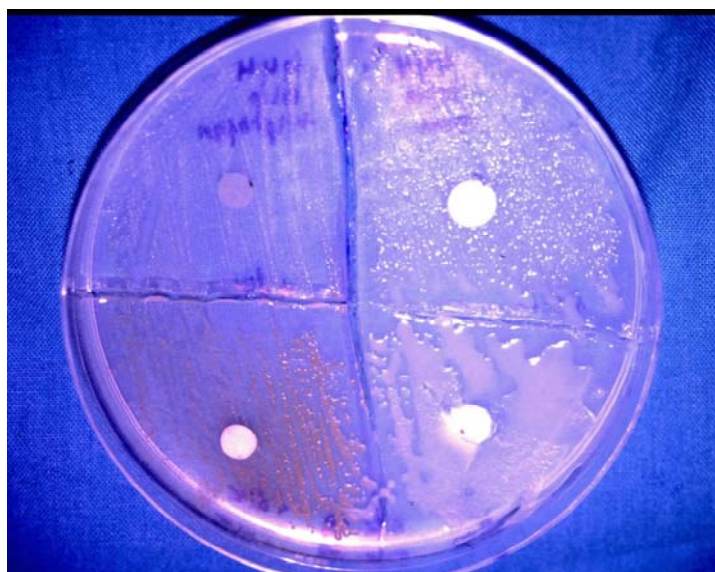


Figura 3: Crecimiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* sobre medio de L-canavanina-glicina-azul de bromotimol.



Una vez confirmado que pertenecían a la variedad *gattii* se procedió a la determinación de los serotipos de las cepas mediante la técnica de aglutinación en porta con sueros específicos utilizando el sistema de “Crypto Check” (Iatron Labs Inc., Tockio, Japon).

Esta prueba demostró que todas las cepas pertenecían al serotipo B. Se usaron como cepas control ATCC 90112 y RV 56164 serotipo A, RV 20185 serotipo B, RV 45978 serotipo C y RV 68038 serotipo D, siendo los resultados correctos para todas las cepas de referencia.

Para confirmar este hallazgo se remitieron las cepas al Laboratorio de Micología Experimental de Antwerp, Bélgica, dirigido por la Dra Swinne, donde los resultados fueron idénticos.

La Facultad de Veterinaria de Cáceres confirmó la procedencia autóctona de estos animales tal como indica además el nombre de su raza (verata, serrana y murciana).

Los cinco brotes ocurrieron en tres años distintos y en diferentes áreas alejadas entre sí. Se constató la presencia de árboles de *Eucalyptus camaldulensis* en la zona de pastoreo de los animales. Estos árboles habían sido importados de Francia e introducidos a principios del siglo XX, y en gran cantidad para reforestación entre los años cincuenta y setenta. La especie que se encuentra con mayor frecuencia es *E. camaldulensis*, pero también se puede hallar *E. globulus*. A partir de 1980 no ha habido más campañas de reforestación con estos árboles.

En vista de estos resultados se contactó con los Hospitales de las dos provincias de Extremadura para recabar cepas clínicas y estudiarlas, pero desgraciadamente las cepas aisladas de pacientes habían sido desechadas.

Desde los primeros aislamientos de *C. neoformans* var. *gattii*, esta levadura procedía de áreas tropicales y subtropicales. Kwon-Chung y Bennett, (1984) sugerían que la incidencia de criptococosis era mayor en áreas con temperatura cálida y abundantes lluvias.

Los grupos australianos de Ellis y de Sorrell han realizado numerosos estudios clínicos y epidemiológicos de esta variedad (Ellis, 1987 y 1990a, Mitchell, 1992, Pfeiffer, 1992, Sorrell, 2001). Estos autores fueron los que demostraron que el hábitat natural de *C. neoformans* var. *gattii* estaba asociado con los árboles de la especie *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*. (Ellis 1987, Pfeiffer, 1992).

Los eucaliptos han sido plantados en muchos países por la rapidez de crecimiento siendo útiles para la industria maderera. Ellis y Pfeiffer observaron que la distribución de la enfermedad en los humanos correspondía a la distribución de dichos árboles.(Ellis, 1990a). Recientemente también se ha aislado *C. neoformans* var. *gattii* de otros miembros de eucaliptos, *E. blakely*, *E. gomphocephala* y *E. rudis*.(Pfeiffer, 1997).

Eucalyptus parece ser un nicho ecológico de *C. neoformans* var. *gattii*, de gran importancia, pero sólo para el serotipo B, aunque se ha hallado también en otras muestras ambientales, en un panal de abejas en Uruguay (Gezuele, 1993), o en heces de murciélago (Lázera, 1993). Esto demuestra la insuficiencia de estudios ecológicos en gran parte del mundo.

En un trabajo publicado por Fortes y Lázera (2001) en el que aislan *C. neoformans* var. *gattii* a partir de detritus de un árbol autóctono de la especie *Guettarda acreana* en una selva virgen brasileña en la que no ha habido importación de árboles estas autoras ponen de nuevo en discusión la ecología de *C. neoformans*.

Hay referencias de *C. neoformans* var. *gattii* en numerosos países del continente Americano, Canadá (St-Germain,1988), California (Clancy, 1990, Pfeiffer, 1991), Argentina (Bava,1990), Brasil (Lázera, 1993 y 2000), Colombia (Callejas, 1998), Méjico (Castanon-Olivares, 2000), Perú (Bustamante,1998), pero también en India (Chakrabarti, 1997),Tailandia (Poonwan, 1997), Africa Central (Swinne, 1994), e Italia (Montagna, 1997a, 1997b, Viviani, 2000).

En la literatura científica hay referencias de criptococosis espontánea en diferentes animales, perros (Peluffo, 1976, Malik,1995), gatos (Malik,1992), palomo (M. Hermoso de Mendoza, 1984, Sanchez-Sousa, 1993), búfalos, vacas, ovejas, cabras (Pal, 1989, Chapman, 1990), caballos (Watt, 1970) La mayoría coinciden en que el tracto respiratorio es la puerta de entrada más común de *C. neoformans*. Parece existir una tendencia a que haya una infección criptocócica en áreas adyacentes a la cavidad nasal, sugiriendo que la rinosinusitis micótica puede ser el origen de la primaria infección.

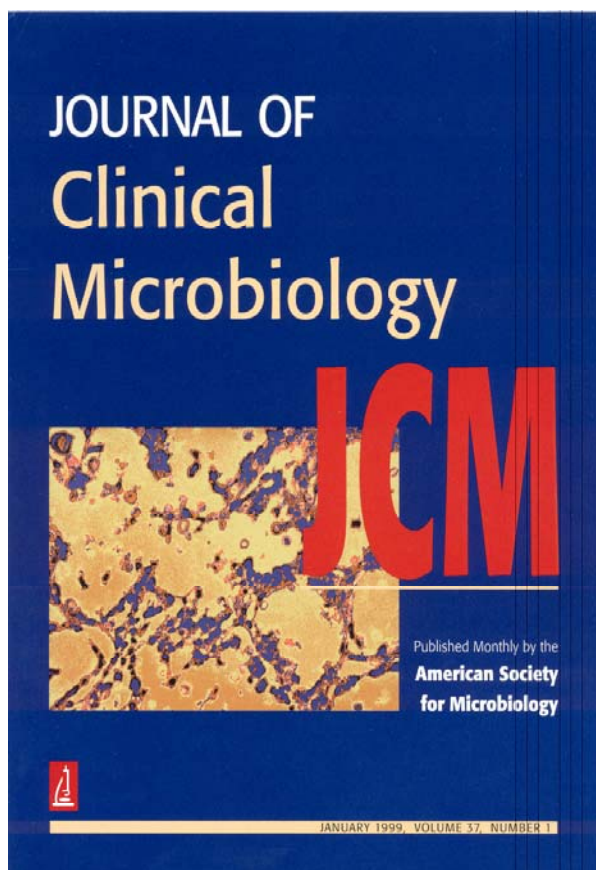
En un estudio, realizado por Malik (1995), en la Universidad Veterinaria de Sidney, sobre 20 casos de criptococosis en perros durante un período de 1981 a 1995, este autor observó que la proporción de *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii* es 75% y 25% respectivamente y que todos los perros con infección por *C. neoformans* var. *gattii* eran del área rural, lo que da más énfasis a la idea de que la exposición a árboles tipo *Eucalyptus* es un importante factor epidemiológico en este tipo de infección.

El hallazgo de que *C. neoformans* var. *gattii* se encuentra en nuestro medio ambiente, junto con otros datos de aislamientos de *C. neoformans* var. *gattii* de zonas templadas (Khol, 1985, Martins, 1996, Montagna, 1997b, Velegraki, 2001) hace variar el concepto de que *C. neoformans* var. *gattii* sólo se encuentra en zonas tropicales.

Debido al hallazgo de la variedad *gattii* en nuestro país se ha iniciado en nuestro laboratorio un estudio de muestras ambientales para la detección de dicha variedad. Para ello se están procesando muestras de hojas, flores, frutos, detritus y corteza de *Eucalyptus* en el momento de la floración, del área de Barcelona y Girona.

Esta línea de trabajo está todavía en estudio y pendiente de tabular todos los resultados.

La figura 1 del artículo se escogió como portada de la revista Journal of Clinical Microbiology.



Este estudio se ha podido realizar gracias a una beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) 96/1991-01.

OBJETIVO 4

Estudio del serotipado de todos los aislamientos de *Cryptococcus neoformans*. Obtención de sueros policlonales específicos.

Artículo II: Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain.

Journal of Clinical Microbiology. 1999; 37:1170-1172.

La criptococosis tiene dos agentes etiológicos causales: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* que se diferencian por caracteres morfológicos, metabólicos, serológicos, y epidemiológicos.

Este estudio ha permitido determinar las biovariedades y los serotipos de 154 cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de muestras clínicas humanas y de animales y muestras ambientales que provenían de diferentes áreas geográficas de España. Un estudio de este tipo para conocer estas características epidemiológicas de la criptococosis nunca se había realizado en nuestro país.

También se consiguió gracias a la colaboración de varios investigadores latinoamericanos disponer de aislados no autóctonos ya que se pudieron recopilar 110 cepas de Centro y Sudamérica. Estos aislados han sido usados para su caracterización fenotípica y para comparar los resultados con los obtenidos de nuestro país.

El primer paso fue confirmar la identificación de todas las cepas remitidas. Para ello se usó la misma metodología usada en la caracterización de las cepas aisladas de cabras.

El estudio de las biovariedades se usó el medio de L-canavanina-glicina-azul de bromotimol y se prepararon discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, impregnados con una solución de los ácidos aminados (D-prolina y D-triptófano) al 20%. Después de realizar un inóculo estandarizado de cada cepa en el medio base “yeast carbon agar” se depositó un disco impregnado con la solución de ac. aminados y se observó crecimiento a las 48 h de incubación alrededor del disco cuando la variedad estudiada es *gattii* y no crecimiento cuando la variedad es *neoformans*. Este método es mucho más barato y más sencillo de realizar que la siembra en el medio de CGB.

Cepas aisladas en España

Todos los aislados clínicos humanos y ambientales correspondieron a la variedad *neoformans*. No se observaron cambios de color en el medio de CGB ni tampoco crecimiento alrededor de los discos con D-prolina y D-triptófano.

Al realizar el estudio de las cepas aisladas de cabras se observó crecimiento y viraje de color de amarillo a azul en medio de CGB y crecimiento de colonias alrededor de los discos impregnados con los ácidos aminados, correspondiendo a la variedad *gattii*.

Debido al elevado número de cepas a estudiar tanto clínicas como de origen ambiental, se planteó la necesidad de obtener los sueros específicos de los cuatro serotipos de *Cryptococcus neoformans*. Para ello tomando como base la técnica propuesta por Evans (1951) se procedió a la inmunización de conejos machos de la raza New Zealand White con un peso medio de 3.5 Kg.

Cuatro cepas de referencia de *C. neoformans* pertenecientes a los cuatro serotipos (A,B,C y D) han servido para la inmunización de los conejos.

Las cepas estaban codificadas como RV (Raymond Vanbreuseghem) y nos fueron remitidas del servicio de Micología de Medicina Tropical de Amberes por la Dra Swinne:

- RV 56164 serotipo A
- RV 20185 serotipo B
- RV 45978 serotipo C
- RV 68038 serotipo D

A diferencia del método usado por Evans (1976), que utilizaba formol para inactivar las levaduras, se ha usado calor, mediante un Baño María a 100°C durante 1 h.

Procedimiento:

1. Preparación del antígeno

Cada cepa perteneciente al serotipo correspondiente, se hizo crecer sobre medio de Sabouraud (14 frascos con un volumen de 200 cc de agar inclinado como mínimo), y se incubaron a 37°C durante 5 días. Se introdujeron en cada tubo 10 ml de suero fisiológico para recoger con una pipeta Pasteur la máxima cantidad de células. Se transfirieron a un frasco estéril para inactivar las células por calor en el baño María a 100°C durante 1h. A continuación se colocaron en tubos cónicos de 50 ml y se procedió a la centrifugación a 3 000 rev durante media hora. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se repitió el lavado con suero fisiológico. Este procedimiento se realizó cuatro veces, y al final se resuspendieron las células en un volumen total de 25 ml con suero fisiológico. A partir de esta suspensión se cultivó en medio de Sabouraud para un control de viabilidad ya que es necesaria la muerte de todas las levaduras antes de la inoculación de los animales.

La concentración de la suspensión madre se realizó por contaje en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración final a 10^8 UFC/ml. A partir de esta concentración se realizaron diluciones de 10^7 y 10^6 UFC/ml en suero fisiológico. Estas diferentes suspensiones fueron alicuotadas a razón de 3 ml en tubos de Eppendorf y conservadas a -70°C hasta su uso.

2. Preparación de los antisueros

Se realizó una toma previa de sangre de cada conejo antes de la inmunización para tener un control negativo.

La inmunización de los conejos se realizó diariamente durante 3 semanas, por vía I/V. Para facilitar las inyecciones se había colocado previamente un catéter en la vena cava superior.

Figura 1: Inoculación de la suspensión de levaduras al conejo por medio del catéter.



Las muestras de sangre para la determinación de los títulos de anticuerpos se extrajeron a través del catéter. Se dió una dosis profiláctica de cloxacilina por vía intramuscular, en el momento de la colocación del catéter y una vez a la semana hasta el final del experimento.

La inmunización se realizó en dosis progresivas de 10^6 , 10^7 y 10^8 células por ml en tres etapas. En la primera semana se administró durante 5 días sucesivos una dosis de 10^6 células/ml cada día seguido de dos días de descanso. La segunda semana se procedió a administrar las dosis de 10^7 células /ml/día con dos días de descanso y en la tercera semana las dosis de 10^8 células /ml/día.

Después de una semana de la última inoculación, se procedió a tomar una muestra de suero para la titulación de anticuerpos. En el caso de que no se llegara a alcanzar un título suficiente para poder realizar la absorción con las levaduras, se administró una dosis de recuerdo a la semana y se volvió a probar. El título mínimo de anticuerpos para proceder a la absorción se estimó en 1/32.

Tabla 1: Título de los sueros sin absorber obtenido con las levaduras de cepas homólogas y heterólogas.

suero sin absorber	A	B	C	D
Anti-A	1/512	1/32	1/2	1/128
Anti-B	1/8	1/64	1/16	1/16
Anti-C	1/2	1/4	1/32	1/8
Anti-D	1/64	1/8	1/2	1/512

Las cepas de *C. neoformans* poseen determinantes antigénicos comunes. Por tanto es lógico encontrar reacciones cruzadas entre las levaduras de los diferentes serotipos, no obstante el título más elevado siempre se encontró con las levaduras homólogas.

3. Absorción de los antisueros

Para la obtención de sueros específicos, se procede a realizar la técnica de absorción con células heterólogas. Consiste en mezclar el antisuero con las levaduras que pertenecen a los serotipos diferentes que el que se ha utilizado para la inmunización.

Procedimiento:

Se cultivaron las cepas de *C neoformans* para la obtención de las células heterólogas, en medio de agar Sabouraud a 25°C durante tres días. Se resuspendieron en suero fisiológico, se inactivaron a 100°C durante 1h. Se centrifugaron y lavaron siguiendo el mismo procedimiento que para la obtención de la suspensión antigénica. En los tubos cónicos usados, se mezcló 1 ml del sedimento de levaduras con 2 ml. del antisuero. Se dejó incubar durante 2 h. a temperatura ambiente y después a 4°C durante toda la noche.

A continuación se centrifugaron a 3 000 rev/min durante ½ h. Se recogió el sobrenadante que corresponde al antisuero absorbido específico, y se realizaron las pruebas de aglutinación con las células homólogas y heterólogas a una concentración de 10^7 células/ml.

Después de la realización de esta técnica los títulos de los antisueros bajaron hasta valores comprendidos entre 1/16 y 1/8 para los antisueros A y D respectivamente y 1/4 y 1/2 para los antisueros B y C respectivamente.

Tabla 2: Título de los sueros no absorbidos y absorbidos con las células heterólogas.

suero	A		B		C		D	
	no-abs	abs	no-abs	abs	no-abs	abs	no-abs	abs
Anti-A	1/512	1/16	1/32	0	1/2	0	1/128	0
Anti-B	1/8	0	1/64	1/4	1/16	0	1/16	0
Anti-C	1/2	0	1/4	0	1/32	1/2	1/8	0
Anti-D	1/64	0	1/8	0	1/2	0	1/512	1/8

La producción de estos antisueros policlonales por inmunización de conejos, ha permitido disponer de gran cantidad de sueros específicos para el estudio de un número elevado de cepas, clínicas y ambientales.

Un alto número de cepas, concretamente 108 aislados, fueron también probados con el "Kit" de aglutinación comercial Crypto Check (Iatron Labs, Japón) para comparar nuestros resultados y como control de calidad de nuestros propios antisueros.

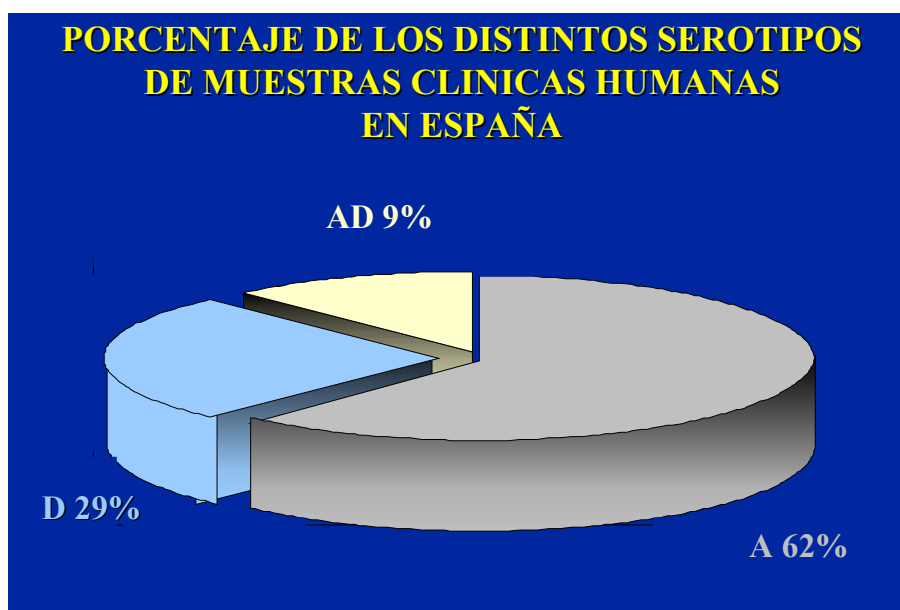
Aislados autóctonos

Los resultados de la distribución de los serotipos de las cepas españolas de *C. neoformans* según su fuente de aislamiento se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Distribución de los serotipos de 154 *C. neoformans* aisladas en España según su origen.

Origen	Nº cepas	Nº (%) de cepas y serotipo				
		A	D	AD	B	C
humano	115	71 (62)	33 (29)	11 (9)	0	0
animal	6	0	0	0	6 (100)	0
ambiental	33	26 (79)	5 (15)	2 (6)	0	0

Figura 2:



El serotipo A es predominante tanto en muestras clínicas (62%) como en ambientales (79%), aunque hay una elevada tasa del serotipo D tanto en los aislados clínicos (29%) como en los ambientales (15%).

Al realizar el estudio según las zonas geográficas se observa que la distribución de los serotipos no es homogénea. (Tabla 2, J. Clin. Microbiol, 1999;37).

En Mallorca todos los aislados estudiados son del serotipo A (100%). El serotipo D es predominante en algunas áreas (Valencia 100%, Madrid 53%). En Sevilla es donde se ha hallado el porcentaje más elevado de cepas AD (20%). Estas cepas fueron solicitadas por la Dra Kwon-Chung del INH para la realización de estudios moleculares.

La distribución irregular de los serotipos es parecida a la descrita en Francia (Dromer, 1996a, y 1996c). En Italia (Griseo, 1997, Tortorano, 1997) la prevalencia del serotipo D va de un 71% en la zona Norte a un 0% en la zona Sur.

En la publicación sobre la epidemiología de la criptococosis en Francia

realizado por F. Dromer, (1996a y 1996c) se comunican datos similares a los hallados en este estudio. El porcentaje de pacientes en Francia con criptococosis y SIDA es muy alto (86%). Le siguen en importancia los pacientes con enfermedades malignas, transplantados y con tratamiento inmunosupresor (corticosteroides). En nuestro estudio el 95% de los pacientes en los que se ha aislado *C. neoformans* tenían una inmunodeficiencia causada por el VIH.

C. neoformans var. *neoformans* es la causante de la criptococosis en las muestras clínicas humanas y el estudio de los serotipos, muestra que el serotipo A que es predominante en nuestro país (62%) también lo es en mayor proporción en Francia (79,5%). El porcentaje de cepas D y AD ha sido superior en los aislados de España (29%, 9%) que en los de Francia (20,5%).

Respecto a la distribución irregular de los serotipos los resultados también son equiparables en los dos estudios. En nuestro país hay zonas donde el serotipo D predomina por ejemplo en Valencia (100%) y Madrid (53%). En Francia, el serotipo D es predominante en el Noroeste, en la zona de la Bretaña (53,6%) y con tasas menores en la zona centro (41,7%) y en el este (41,2%).

No se ha encontrado el serotipo B y C en muestras clínicas humanas, pero sí en muestras clínicas de origen animal concretamente en cabras con criptococosis donde se aisló *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B (100%). (Baró, 1998) de diferentes muestras de necropsia.

Las muestras ambientales de heces de paloma se ha ampliado desde la publicación de este trabajo. Todas las cepas han correspondido a la variedad *neoformans*. El estudio del serotipado ha permitido separarlas en los siguientes grupos.

Tabla 4: Porcentaje de los diferentes serotipos de *C. neoformans* en las muestras ambientales según procedencia.

Procedencia	Nº	A%	D%	AD%
Alicante	23	70	22	8
Barcelona	10	100	0	0
Córdoba	10	100	0	0

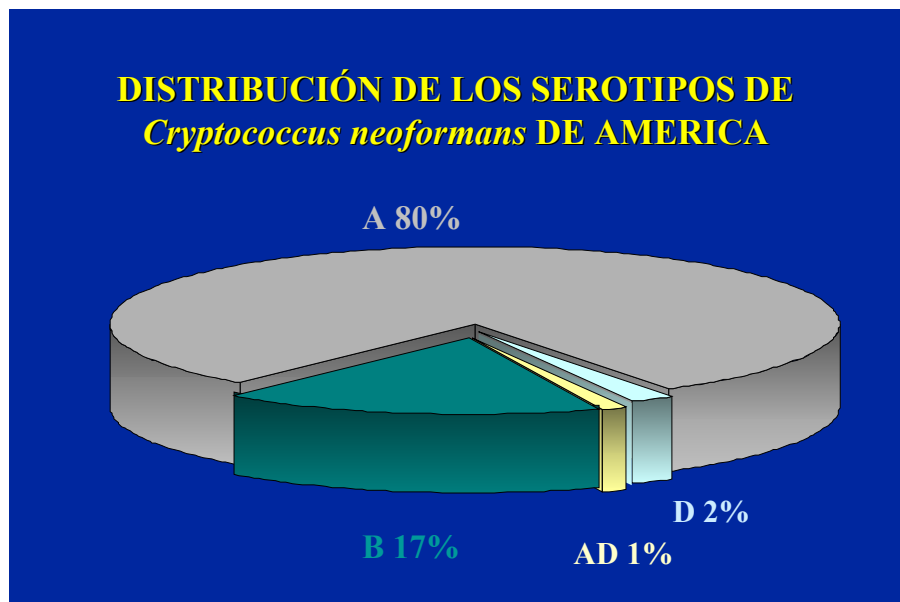
Hay que hacer mención de que el serotipo D en muestras ambientales puede tener una frecuencia elevada como se observa en la zona de Alicante.

En un estudio del serotipado de los aislamientos de *C. neoformans* de muestras de heces de paloma en China (Ansheng, 1993), el serotipo predominante era el A con un 78 % seguido del serotipo AD con un 28%. Estos autores constataron además la presencia en una misma muestra de dos cepas de *C. neoformans* con serotipos diferentes A y AD.

Aislados procedentes de América del Sur y Cuba

Si comparamos los datos encontrados en los aislados españoles con los de Brasil, Cuba y Argentina, observamos en estos últimos la prevalencia mayor para el serotipo A. El serotipo D es muy poco frecuente en estas áreas geográficas como ya habían publicado otros autores. (Bennett, 1977, Kwon-Chung, 1984, 1992). En Brasil se ha hallado una elevada tasa de aislamientos del serotipo B(41%).

Figura 3:



Es de resaltar que gracias a este estudio se ha detectado el primer aislamiento de *C. neoformans* var. *gattii* en un felino "cheeta" (*Acinonyx jubatus*) del Zoo de la Habana en Cuba que sufría de criptococosis.

El estudio de las biovariedades y los serotipos provee de una interesante información y permite discernir entre diferentes cepas.

El medio de CGB junto con el estudio de la utilización ó no de ácidos aminados nos ha permitido separar correctamente y sin ninguna dificultad las dos variedades de *C. neoformans*.

Los factores responsables de la diferente distribución de los serotipos A y D no es conocida y parece que puede variar con el tiempo como se ha comprobado en el estudio realizado por Steenbergen (2000) en el área de New York. Es por ello que son necesarios estos estudios epidemiológicos que permiten determinar los serotipos de las diferentes partes del mundo y su posible variación en el tiempo.

Este trabajo se ha podido realizar gracias a una beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias 96/1991-01 y a la colaboración de todos los

colegas que nos han proporcionado las cepas de *C. neoformans* .

OBJETIVO 5

Determinar la sensibilidad de las cepas de *Cryptococcus neoformans* a cuatro antifúngicos sistémicos, utilizados en la actualidad para el tratamiento de la criptococosis, anfotericina B , 5-fluorocitosina, fluconazol y itraconazol, mediante el estudio de las concentraciones mínimas y relacionarla con los serotipos.

Artículo III: Relationship between *in vitro* activity of four antifungal drugs and the serotypes of *Cryptococcus neoformans*.

Journal de Mycologie Médicale. 2001; 11: 185-190

La infección por *Cryptococcus neoformans* es un problema muy importante en los pacientes con inmunodepresión, particularmente los enfermos de SIDA en los cuales puede ser causa de fallecimiento.

La infección criptocócica en pacientes con SIDA se considera muy difícil de curar y además es necesario un tratamiento muy prolongado. El riesgo de recaídas suele ser alto después de la terapia antifúngica inicial. (Kovacs, 1985).

Por esta causa, en las infecciones criptocócicas, se tiende a dar una terapia supresora con antifúngicos de por vida. En los últimos años, el fluconazol se considera el de elección para este tipo de terapia ya que se puede suministrar por vía oral, y suele tener pocos efectos secundarios. (Larsen, 1994, Saag, 2000).

El desarrollo de métodos de rutina para el estudio de la sensibilidad de *C. neoformans* es importante ya que puede facilitar la elección de los antifúngicos y proveer de una guía que permita seleccionar las dosis apropiadas de los mismos. El método utilizado para el estudio de la sensibilidad *in vitro* debería además ser reproducible y permitir monitorizar la terapia antifúngica.

En este artículo original, se ha propuesto conocer la actividad *in vitro* de

cuatro antifúngicos con acción sistémica, y por ello su utilidad en el tratamiento de la criptococosis. Se ha estudiado la sensibilidad de las 128 cepas clínicas de origen humano, aisladas de diferentes regiones geográficas de España frente a anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol.

Como objetivo secundario, pero de gran interés conceptual se ha querido comprobar también si existe una relación entre el serotipo y la sensibilidad a los diferentes antifúngicos estudiados.

El método usado es el propuesto en el documento M27-A por parte del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997) en el que se estudia las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mediante un sistema de dilución en microplacas.

Es un método en el que se ha intentado estandarizar al máximo las posibles variables para que los resultados sean reproducibles entre los diferentes laboratorios. El inóculo, la composición del medio, la temperatura y el tiempo de incubación, y la determinación de los puntos de corte para cada antifúngico son las variables experimentales que se han protocolizado. Sin embargo este método de referencia es muy laborioso y de difícil incorporación a un laboratorio de rutina.

Principales características del método de referencia M27A:

Método	Microdilución en caldo (volumen final 200 μ l).
Medio	RPMI-1640 +glutamina + 2% glucosa Tampón MOPS (0.165 mol/L) pH 7.0
Inóculo final	0.5 - 2.5 x 10 ³ UFC/ml
Temperatura	35°C
Tiempo incubación	48h. (<i>Candida</i> sp) y 72h. (<i>C. neoformans</i>)
Lectura	visual y automática (A ₄₂₀)

Punto de corte Anfotericina B menor concentración de antifúngico en que

hay ausencia de turbidez.

5-fluorocitosina y azoles menor concentración de antifúngico que produce un 80% de reducción de turbidez comparado con el pocillo control.

Cepas *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112)

de Referencia *Candida albicans* (ATCC 90028)

Candida krusei (ATCC 6258)

Basándonos en las publicaciones de otros autores (Anaissie, 1993, Espinel-Ingroff 1996a) y en nuestra propia experiencia en estudios de sensibilidad en hongos, se escogió el medio de RPMI para realizar este estudio. El medio RPMI-1640 (con glutamina, sin bicarbonato) se tampona a pH 7 con ácido N-morpholino-propanesulfónico 0.165 mol/L (MOPS) y se le añade un 2% de glucosa; la adición de glucosa produce un incremento del crecimiento de las levaduras (Rodríguez-Tudela, 1994, 1995).

Todavía no hay un consenso sobre qué medio es el ideal para realizar los estudios de sensibilidad en *Cryptococcus neoformans*. Hay trabajos en los que se recomiendan otros medios a parte del RPMI como es el medio Yeast Nitrogen Base (YNB) a pH 7 ó pH 5.4 (Ghannoum, 1992, Sanati, 1996, Jessup 1998).

Por ello realizamos un estudio previo comparativo con 20 cepas de *Cryptococcus neoformans* entre los dos medios RPMI 1640 con un 2 % de glucosa a pH 7 y Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) con un 0.5% de glucosa tamponado con MOPS a pH 7, para comprobar si el incremento en el crecimiento de esta levadura era significativo. Al no encontrar diferencias y ser más dificultosa la lectura en las placas con el medio de Yeast Nitrogen Base se escogió el medio estandar de RPMI 1640 (Franzot, 1996, Rex 1997) para realizar los diferentes estudios que se habían propuesto.

Siguiendo las recomendaciones dadas por el National Committee for

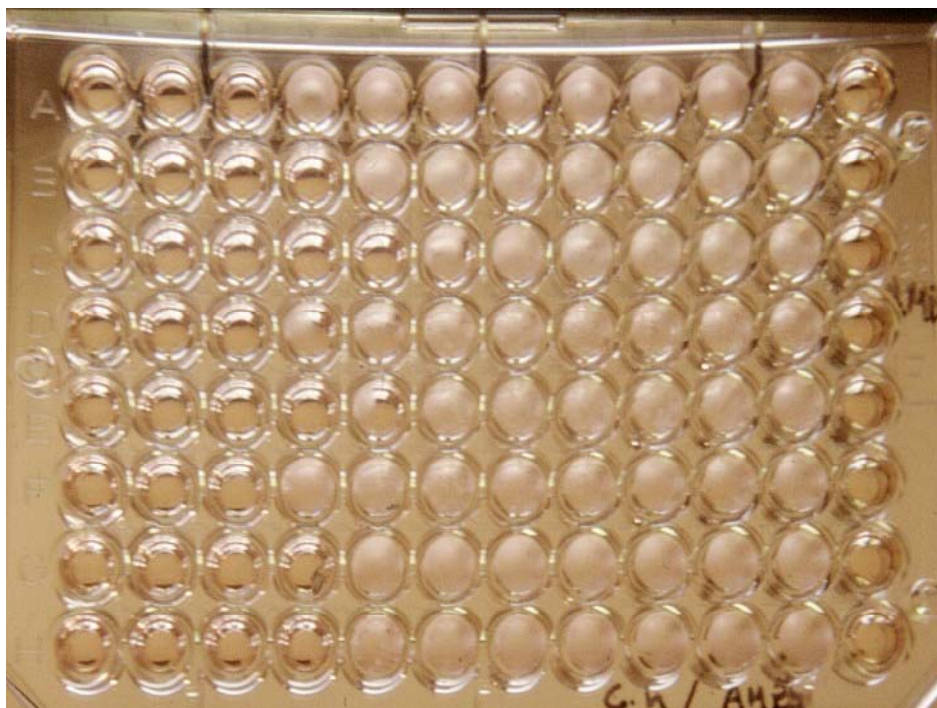
Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997, document 27A), para la realización del estudio de sensibilidad (inóculo, tiempo de incubación, medio, determinación del punto de corte) se estudiaron las sensibilidades de 122 cepas clínicas de *C. neoformans* de diferentes pacientes y 6 cepas de tres pacientes que tenían dos aislamientos diferentes por el serotipo, en sucesivos episodios de criptococosis. Todos estos aislamientos se obtuvieron de 11 hospitales de 6 regiones geográficas diferentes de España durante un período de 10 años (1988 a 1998).

Todas las cepas fueron previamente identificadas por los procedimientos estandar. (Barnett, 1983) y se realizó el estudio del serotipado a todas ellas con los sueros policlonales obtenidos en nuestro laboratorio.

Se incorporaron a cada tanda de experimentos tres cepas de referencia, *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112), *Candida albicans* (ATCC 90028), y *Candida krusei* (ATCC 6258).

La lectura de los puntos de corte se realizó visualmente con un espejo inclinado y seguidamente de forma instrumental mediante un lector de microplacas (Labsystems, Multiskan MS, Finland) que determinó las absorbancias previa agitación de 15 segundos de las placas.

Figura 1: Estudio de las CIM de la anfotericina B sobre 8 cepas de *Cryptococcus neoformans* mediante el método en microplaca.



La sensibilidad de las 128 cepas clínicas de *C. neoformans* fue ensayada para los cuatro antifúngicos.

Tabla 1: Actividad *in vitro* de 4 antifúngicos frente a 128 cepas de *Cryptococcus neoformans*. Rango y CIM para inhibir el 50 y 90% de las cepas.

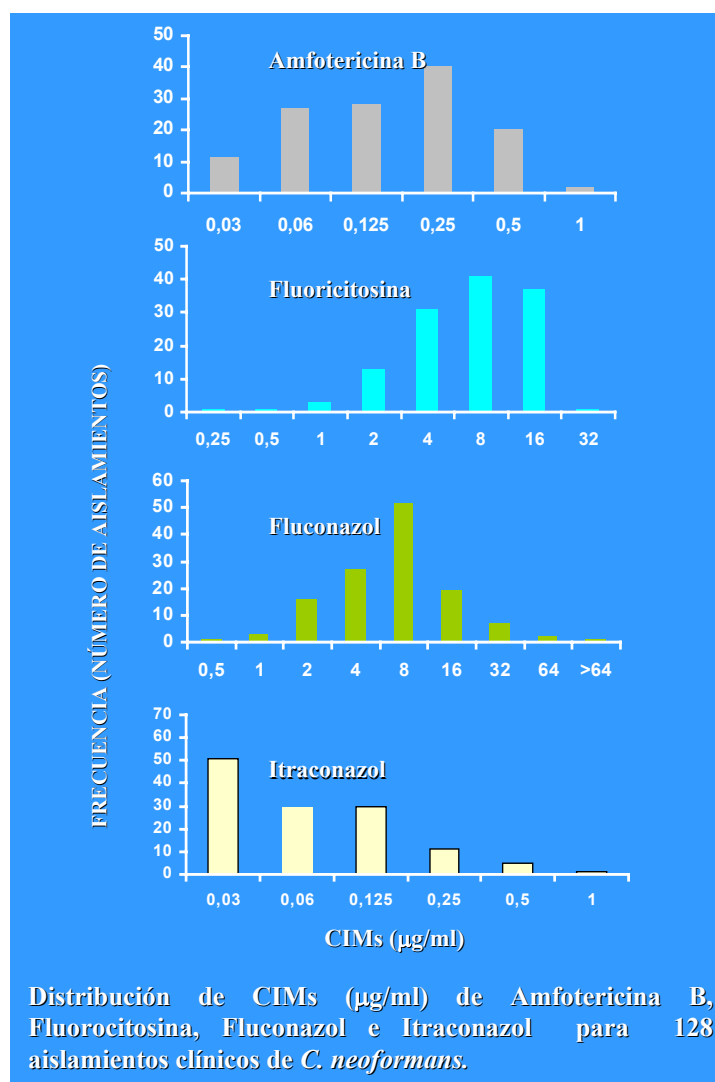
Antifúngico	CIM ($\mu\text{g/ml}$)		
	Rango	50%	90%
Amfotericina B	0.03-1	0.125	0.5
5-Fluorocitosina	0.25-32	8	16
Fluconazol	0.5->64	8	16
Itraconazol	0.03-1	0.06	0.25

Las CIMs de las cepas de referencia estaban dentro de los valores propuestos por la NCCLS.

Dentro del grupo de los triazoles, fluconazol muestra menor actividad que

itraconazol, aunque se ha visto que tiene mayor actividad *in vivo* ya que se encuentran altas concentraciones de este antifúngico en el líquido cefalorraquídeo. (Aller, 2000).

Figura 2: Distribución de las CIM de los cuatro antifúngicos, anfotericina B, fluorocitosina, fluconazol e itraconazol para 128 cepas de *C. neoformans*.



Anfotericina B

No se ha encontrado ninguna cepa de *C. neoformans* con CIM > 1 µg/ml para anfotericina B aunque dos aislamientos provenientes de Andalucía tenían una CIM de 1 µg/ml. Estas dos cepas eran del serotipo A.

5-Fluorocitosina

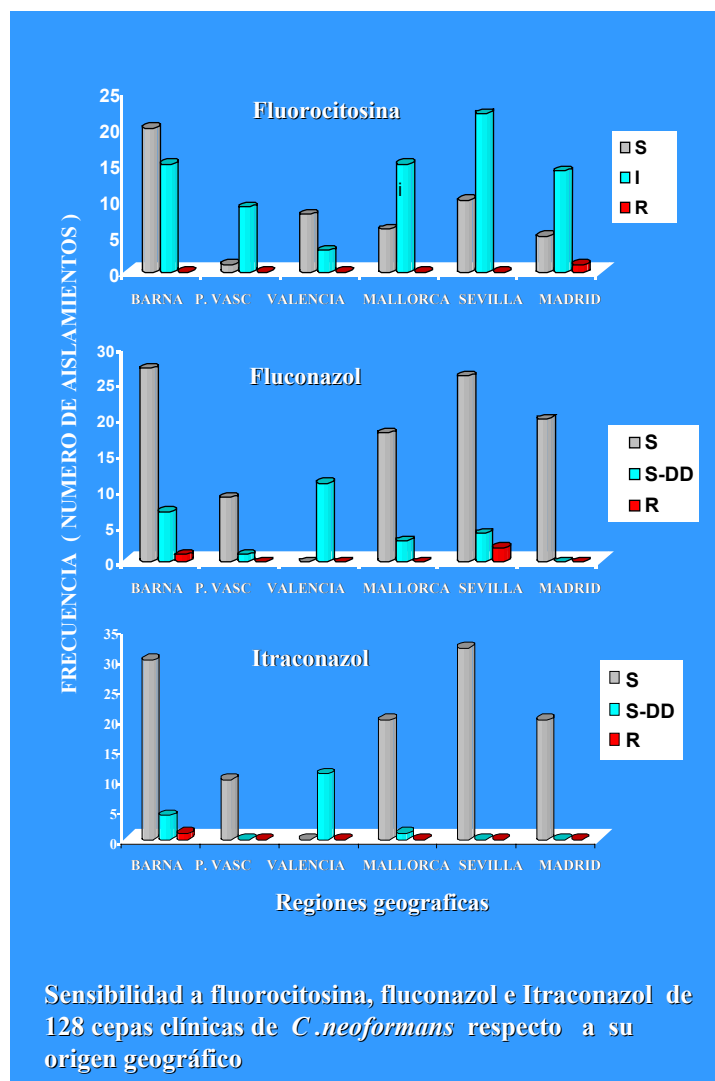
De los cuatro antifúngicos, 5-fluorocitosina es el que presenta menor actividad frente a *C neoformans* con una $P < 0.0001$ al aplicar el test de Kruskal-Wallis. El 60 % presentan CIMs elevadas entre 8-16 $\mu\text{g/ml}$ y un aislado clínico de Madrid tenía una CIM de 32 $\mu\text{g/ml}$. Al estudiar el serotipo de esta cepa se comprobó que correspondía al serotipo D.

Azoles

Respecto al estudio de los triazoles, fluconazol muestra un 78 % de cepas con unas CIMs $< 8 \mu\text{g/ml}$, 20 % con CIM entre 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$ y 3 cepas que representan un 2,5 % con $\text{CIM} \geq 64 \mu\text{g/ml}$. Al realizar el serotipado de estas tres cepas, se comprobó que dos de ellas pertenecían al serotipo A y una al serotipo AD.

Itraconazol muestra un porcentaje elevado de cepas con CIMs con valores bajos, el 87 % de ellas tenían una CIM de $\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$, un 12 % estaban en el intervalo de CIMs de 0.25 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y sólo una cepa del serotipo A mostró un nivel alto de $\text{CIM} = 1 \mu\text{g/ml}$. a su vez tenía una CIM de 32 $\mu\text{g/ml}$ para fluconazol. Esta cepa provenía de Cataluña.

Figura 3: Sensibilidad a 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol de las 128 cepas clínicas según su origen geográfico.



El antifúngico que muestra menor actividad es 5-fluorocitosina, excepto en la zona de Valencia que muestra un 73% de sensibilidad ($P < 0.05$).

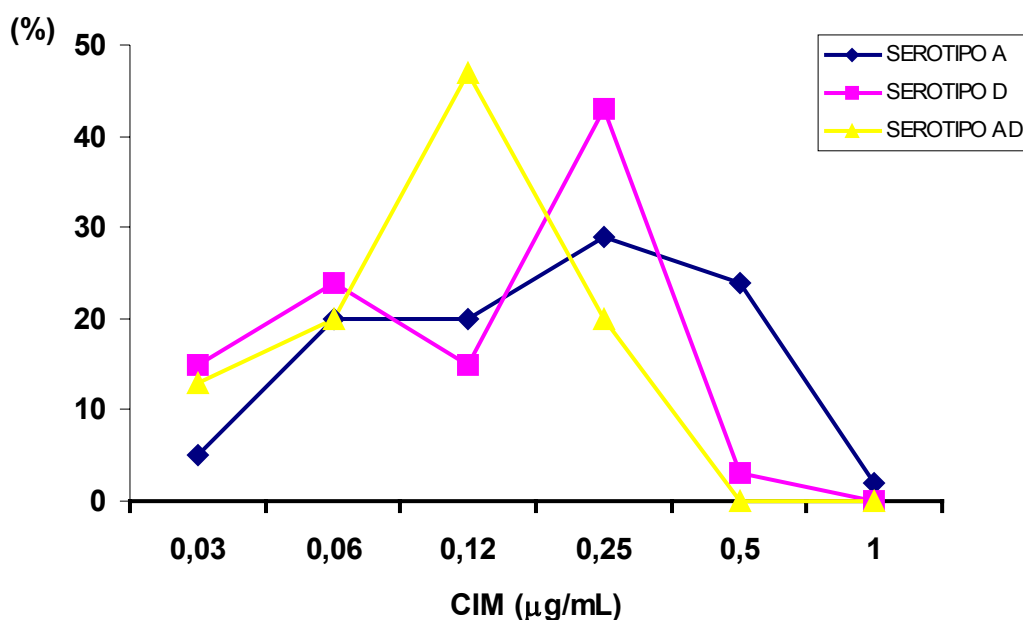
Con respecto a los azoles la zona de Valencia es donde se halla el porcentaje de cepas con CIMs elevadas. Todas las cepas estaban en el intervalo 16-32 $\mu\text{g/ml}$ para fluconazol y 0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$ para itraconazol.

Al comparar las CIMs obtenidas con anfotericina B con respecto a los

serotipos mediante el test de Kruskal Wallis se ha comprobado que a pesar de que todas las cepas son sensibles a este antifúngico, las cepas del serotipo A mostraban una menor sensibilidad con una CIM media de 0.25 $\mu\text{g/ml}$, mientras que los serotipos D y AD tenían una CIM media de 0.125 ($P < 0.05$).

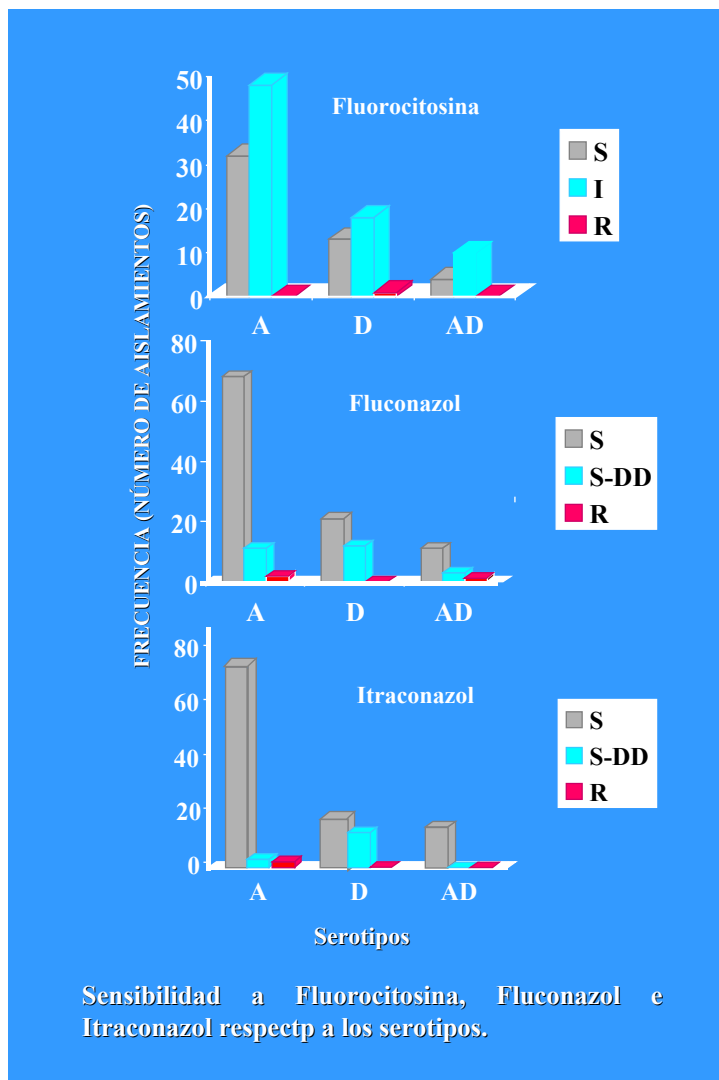
Figura 4:

Relación entre Anfotericina B y los Serotipos de *C. neoformans*.



Para relacionar el resto de antifúngicos con los serotipos nos hemos basado al igual que otros autores (Nguyen, 1998) en los puntos de corte de *Candida sp* para considerar una cepa como sensible, intermedia o resistente. Estos puntos de corte de las CIMs se compararon con los serotipos usando el test de Chi cuadrado.

Figura 5: Sensibilidad de 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol respecto a los serotipos de las 128 cepas de *Cryptococcus neoformans*.



No se han encontrado diferencias significativas al relacionar los serotipos y la sensibilidad a la 5-fluorocitosina. En cambio con respecto a los dos triazoles estudiados el serotipo D muestra menor sensibilidad ($P > 0.00001$). Se ha encontrado en este estudio que el 60 % de las cepas estaban dentro del intervalo 16-32 $\mu\text{g/ml}$ para fluconazol y 0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$ para itraconazol.

También se ha realizado el estudio de la sensibilidad antifúngica ($\mu\text{g/ml}$) de las 13 cepas de *C. neoformans* var. *gattii* aisladas de 6 cabras con criptococosis de la provincia de Cáceres.

Tabla 2: Valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) de anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol para 13 cepas de *Cryptococcus neoformans* var *gattii* aisladas de 6 cabras en 5 localidades de Cáceres.

Procedencia	AMB	FC	FNC	ITZ
Pescueza	0.25	2	4-8	0.125
Serradilla	0.25	2-4	8-16	0.25
Casas Millan	0.25	2	8-16	0.25
Vera 1	0.25	2-4	8-16	0.125-0.25
Vera 2	0.25	4	8	0.125
Madroñera	0.25	2-4	16	0.25

Todas las cepas aisladas de *C. neoformans* var. *gattii* de cabras muestran una sensibilidad uniforme con respecto a los cuatro antifúngicos estudiados, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ para anfotericina B, entre 2-4 $\mu\text{g/ml}$ para 5-fluorocitosina, 4-16 $\mu\text{g/ml}$ para fluconazol y 0.125- 0.25 para itraconazol. No se ha encontrado ningún valor de CIM alto a los cuatro antifúngicos testados.

Con respecto al estudio de la sensibilidad antifúngica realizado a las 33 cepas de *C. neoformans* procedentes de muestras de palomas, los valores hallados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3: Valores de las CIM a 4 antifúngicos de 33 cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de palomas.

Antifúngico	CIM ($\mu\text{g/ml}$) ^a		
	Rango	50%	90%
Anfotericina B	0.06-1	0.25	0.5
Fluorocitosina	2-16	8	16
Fluconazol	4-16	4	16
Itraconazol	0.03-0.5	0.125	0.5

^a CIMs en las que se inhibe el 50% y 90% de las cepas respectivamente.

En esta muestra estudiada se observa que la sensibilidad no es uniforme, los rangos de los antifúngicos son amplios, pero no tanto como en los

hallados en las cepas de procedencia humana.

Investigadores de diferentes países han publicado estudios de sensibilidad *in vitro* con los cuatro antifúngicos estudiados. (Gargani, 1992, Franzot, 1996, Sanati 1996, De Bedout 1999). Sin embargo en nuestro país no se había realizado un estudio de estas características y con tan elevado número de cepas de *Cryptococcus neoformans*.

Se ha publicado recientemente un trabajo del Grupo de Epidemiología de la criptococosis de la Asociación Española de Micología coordinado por la Dra F. Colom en el cual también se ha integrado nuestro grupo de trabajo (Colom, 2001). En este artículo se presentan datos epidemiológicos de la criptococosis en España, durante dos años, 1998-1999, justo el período posterior a este estudio. En este trabajo se puede contrastar que los datos que hemos obtenido coinciden mayoritariamente con los presentados por esta autora. El grupo de riesgo más afectado continúa siendo el de los pacientes afectados por el VIH (86% vs 95%). Todos los aislamientos clínicos humanos correspondieron también sólo a la variedad *neoformans*. El serotipo A continúa siendo el mayoritario (45,5% vs 62%) seguido del serotipo D (22.7% vs 29%), el serotipo AD es el que más se ha incrementado (22.7% vs 9%). En este trabajo no se ha incluido el estudio de la sensibilidad *in vitro* de las cepas de *C. neoformans*, por lo que siguen siendo nuestros datos sobre sensibilidad y serotipos la referencia para España.

No hay todavía un consenso en los puntos de corte que establezcan si una cepa de *C. neoformans* es sensible, intermedia o resistente a un determinado antifúngico como se ha producido para *Candida* sp. (documento M27-A, NCCLS 1997). Sin embargo aparecen trabajos en los cuales para relacionar y evaluar las sensibilidades se han adaptado a *C. neoformans* los puntos de corte aceptados para *Candida* sp. (Nguyen, 1998, De Bedout, 1999).

Es importante conocer las sensibilidades de determinadas cepas sobre todo cuando se producen recaídas o también reinfecciones en el tiempo.

Se acepta que los valores hallados *in vitro* pueden influir en la eficacia del tratamiento. Cepas con CIM bajas, que se podrían considerar como sensibles, no van a predecir un éxito en el tratamiento, sin embargo una CIM alta va a producir con mucha probabilidad un fallo terapéutico. (Aller,2000, Espinel-Ingroff, 1998a, Rex, 1997).

Francoise Dromer (1996a) sugiere que puede haber factores individuales y ambientales que pueden asociarse con el serotipo. En su estudio, las infecciones causadas por el serotipo D se daban en personas mayores de 60 años, que recibían terapia con corticosteroides y que tenían lesiones en la piel.

En nuestro caso hemos hallado diferencias al relacionar los serotipos y la sensibilidad a los antifúngicos. El serotipo A es el que muestra menor sensibilidad para anfotericina B, no hay diferencias significativas para 5-fluorocitosina, y el serotipo D es el que muestra menor sensibilidad para los azoles.

Todos estos resultados deberían confirmarse siguiendo esta línea de trabajo con un mayor número de cepas.

Es importante conocer a lo largo del tiempo el estado de la sensibilidad y resistencia de las cepas aisladas en nuestro medio ambiente y comparar los resultados con los hallados en las diferentes partes del mundo por si hay diferencias significativas locales, para proponer la política antifúngica más adecuada. Es muy necesario también para detectar la emergencia de cepas resistentes de *C. neoformans* y el estudio de las sensibilidades de los nuevos antifúngicos.

Este trabajo se ha podido realizar gracias a una beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) 96/ 1991-01 del Ministerio de Sanidad.

OBJETIVO 6

Realización de un estudio comparativo del método estandar respecto a un sistema colorimétrico comercial para la valoración de su eficacia y reproductibilidad.

Artículo IV: *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000; 45: 645-649.

Las infecciones fúngicas graves en pacientes inmunodeprimidos se han incrementado en los últimos tiempos. Las levaduras son una importante causa de infección nosocomial y la principal causa de morbilidad y mortalidad en este tipo de pacientes (Berrouane, 1999). El uso de agentes como la anfotericina B, y los azoles en el curso de terapias prolongadas, ha incrementado el riesgo de la aparición de cepas resistentes. (Powderly, 1988, Dromer, 1997, Lozano-Chiu, 1998).

A principios de 1990, se hicieron grandes esfuerzos para la estandarización de las técnicas de sensibilidad a los antifúngicos y lograr que los resultados fueran rápidos, seguros y reproducibles. La publicación de la normativa realizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 1997) documento M27-A, se ha considerado como la normativa a seguir para la realización del estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias en las levaduras y por supuesto también para *Cryptococcus neoformans*. Se han dado los puntos de corte de *Candida sp* para 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol.

Este método es reproducible, pero muy laborioso de realizar sobre todo en los laboratorios de rutina clínicos donde hay la necesidad de diagnosticar e

instaurar un tratamiento adecuado lo más rápidamente posible (Ponton, 1996, Quindós 1996).

Han aparecido métodos comerciales como *Sensititre*[®] (Pfaller, 1994a, 1994b, Davey 1998), *Etest*[®] (Chen, 1996a, Colombo, 1995, Linares, 1998, Martin-Mazuelos, 1999, Sewell, 1994, Torres-Rodríguez, 1997), *ATB-Fungus*[®] (Quindós, 1994, Martínez, 1998), *NeoSensitabs*[®] (Swinne, 1999, Carrillo 1999a), *Fungitest*[®] (Davey, 1998, Swinne, 1999), *ASTY* colorimetric panel (Pfaller, 1998) en los que se han estandarizado las posibles variables y que los resultados fueran reproducibles.

ATB-Fungus[®] se basa en un método de microdilución ajustado a los puntos de corte, permitiendo una fácil lectura de los resultados. Se utiliza una galería de pocillos con diferentes concentraciones de antifúngicos.

NeoSensitabs[®] (Rosco Diagnostica, Toastrup, Dinamarca) es un método de difusión en agar usando tabletas para determinar la sensibilidad a los antifúngicos que se usan con mayor frecuencia en los laboratorios de rutina. Se dispone de 21 antifúngicos diferentes. Plantea problemas con los agentes no hidrosolubles viéndose limitada su difusión en el medio.

Fungitest[®] (Sanofi Diagnostics Pasteur, París, Francia) es un método estandarizado que determina la sensibilidad de las levaduras y que se ha adaptado a las normativas del método de referencia de la NCCLS. Se incluyen 6 antifúngicos con dos concentraciones diferentes en medio tamponado de RPMI 1640 con presencia de un indicador de cambio de potencial redox.

Etest[®] (AB Biodisk, Solna, Sweden). Es un método sencillo de realización. Se usan tiras impregnadas con un gradiente de antifúngico que se aplican a las placas de medio de cultivo. Debido al gradiente de concentración del antifúngico se puede observar un halo de inhibición en forma elíptica que

nos va a dar el valor de la CIM. Se recomiendan diferentes medios de cultivo para cada antifúngico. La lectura a veces es difícil y presenta el inconveniente de la interpretación de los puntos de corte con determinadas cepas.

Sensititre[®] YeastOne (Alamar Bioscience Inc. Westlake, OH, USA) es un sistema que permite el estudio de las CIMs de 5 antifúngicos en microplacas que vienen preparadas con las concentraciones de los diferentes antifúngicos y llevan incorporado en los pocillos el colorante azul Alamar que facilita la lectura visual de las CIMs sin necesidad de utilizar espectrofotómetro. Es un método sencillo de realizar en un laboratorio de microbiología clínica y que se ajusta a las normas del documento M27- A de la NCCLS.

En el estudio que se ha realizado, se han evaluado los resultados de las CIMs de 42 cepas clínicas de *Cryptococcus neoformans* obtenidos mediante el método colorimétrico *Sensititre/Alamar* y se han comparado con los obtenidos mediante el método de referencia en microdilución de la NCCLS (documento M27-A).

Las 42 cepas clínicas españolas de *C. neoformans* var. *neoformans* se aislaron de pacientes VIH +. Se han usado además varias cepas de control de calidad *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, y las cepas de referencia *Candida albicans* ATCC 90028, y *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 para comprobar que los resultados obtenidos estaban dentro del rango deseado.

Todas las cepas fueron subcultivadas en agar glucosado de Sabouraud e incubadas a 35° C durante 24 horas para *Candida* spp y 48 horas para *C. neoformans* para la obtención de un crecimiento óptimo.

Método colorimétrico

Se realizaron las suspensiones “stock” de todas las cepas en tampón fosfato salino (PBS) y se ajustó la concentración final al patrón de 0.5 de la escala de Mc-Farland.

Las suspensiones de trabajo se prepararon añadiendo 20 µl de la suspensión “stock” a tubos que contenían 11 mL de caldo de RPMI 1640 tamponado con MPOS a pH 7 para realizar el inóculo. El resultado final es de $1.5 \times 10^3 - 8 \times 10^3$ células /mL. Se inocularon 100 µl de los tubos de RPMI 1640 a los pocillos de los paneles YO1 de *Sensititre* .

Los paneles YO1 se incubaron a 35°C durante 48 horas para *Candida* spp y 72 horas para *C. neoformans*.

Para verificar la densidad del inóculo, que debería corresponder a un crecimiento entre 15 y 80 colonias se sembraron 10 µl de los inóculos en placas de agar glucosado de Sabouraud .

Las concentraciones de antifúngicos empleadas fueron de 0.008 a 16 mg/L para anfotericina B, itraconazol y ketoconazol; de 0.125 a 256 mg/L para fluconazol y de 0.03 a 64 mg/L para 5-fluorocitosina.

La determinación de las CIMs se realizó por observación del cambio de color del indicador, de azul a rojo en los diferentes pocillos. La CIM se determinó como la concentración menor de antifúngico que no muestra cambio de color.

Figura 1: Sensibilidad de *Cryptococcus neoformans* mediante paneles YO1 de Sensititre.



Método de Referencia

El método de microdilución en placa se realizó de acuerdo con las recomendaciones del documento M27-A usando el caldo RPMI 1640 al que se le ha añadido un 2 % de glucosa y tamponado con MOPS a pH 7. El método seguido ha sido descrito en el Objetivo 5.

Las concentraciones de los antifúngicos fueron de 0.03 a 16 mg/L para anfotericina B (Squibb, Princeton, NJ, USA), ketoconazol e itraconazol (Janssen Biotech, Beerse, Belgium), de 0.125 a 64 mg/L para fluconazol (Pfizer Inc, New York, USA) y 5-Fluorocitosina (La-Roche Laboratory Inc., Nutley, NJ, USA).

Las placas se incubaron 72 horas a 35°C. Se determinó la absorbancia mediante espectrofotómetro a 420 nm previa agitación de las placas durante 15 seg.

La CIM para anfotericina B se ha definido como la menor concentración de antifúngico que produce una inhibición del 100%, no se observa turbidez.

La CIM del resto de antifúngicos se definió como la menor concentración de antifúngico que produce un 80% de reducción de la turbidez comparado con el crecimiento control.

Resultados y discusión

La lectura de los resultados para *C. neoformans* por el método colorimétrico se tuvo que realizar a las 72 horas ya que a las 48 horas un 40% de las cepas no producían cambio de color en el pocillo de control de crecimiento. Ya es conocido que *C. neoformans* tiene mayor dificultad de crecimiento en el medio de RPMI 1640 que *Candida* spp.

Las CIMs que correspondían a 0.008 y 0.016 mg/L para anfotericina B, ketoconazol e itraconazol por el sistema *Sensititre* se consideraron equivalentes a las CIMs que tenían un valor ≤ 0.03 mg/L obtenidas mediante el método de referencia.

Tabla 1: Distribución de las CIMs (mg/L) frente a anfotericina B y 5-fluorocitosina de las 42 cepas de *C. neoformans* estudiadas con el sistema colorimétrico y el método de referencia. Los resultados se dan en porcentajes.

CIM	Anfotericina B		5-Fluorocitosina	
	Alamar	NCCLS	Alamar	NCCLS
0.016	38	-	-	-
0.03	57.1	31.11	-	-
0.06	4.7	28.89	2.3	-
0.125	-	13.33	2.3	-
0.25	-	22.22	9.5	-
0.5	-	4.44	2.3	6.25
1	-	-	11.9	8.33
2	-	-	47.6	29.17
4	-	-	23.8	22.92
8	-	-	-	31.25
16	-	-	-	2.08
Rango	0.016-0.06	<0.03-0.5	0.06-4	0.5-16
Media	0.026	0.143	2.06	6.319
CIM₅₀	0.03	0.06	2	4
CIM₉₀	0.03	0.25	4	8

Se han encontrado diferencias significativas en el rango y la distribución de las CIMs para anfotericina B y 5-fluorocitosina. El rango es más amplio y los valores de las CIMs mayores en el método de referencia comparado con el sistema colorimétrico (anfotericina B, 0.143 vs 0.026 mg/L, $P < 0.005$; 5- fluorocitosina, 6.319 vs 2.06 mg/L, $P < 0.0005$).

No se ha detectado ninguna cepa con valores altos de CIMs > 1 mg/L para anfotericina B en ninguno de los dos métodos.

Hay un 32 % de cepas que se hallan en el intervalo 8-16 mg/L para 5-fluorocitosina por el método de referencia y que no se detectan por el sistema Alamar.

Tabla 2: Distribución de las CIMs en mg/L de las 42 cepas de *C. neoformans* frente a fluconazol, itraconazol y ketoconazol mediante el sistema colorimétrico y el método de referencia.

CIM	Fluconazol		Itraconazol		Ketoconazol	
	Alamar	NCCLS	Alamar	NCCLS	Alamar	NCCLS
0.008					7.1	-
0.016			2.3	-	14.2	-
0.03			9.5	57.14	33.3	81.39
0.06	2.3	-	45	11.90	38	4.65
0.125	2.3	-	33	14.29	4.7	9.30
0.25	-	-	7.1	9.52	2.3	2.33
0.5	2.3	4.26	2.3	7.14	-	2.33
1	7.1	17.02	-	-	-	-
2	14.2	10.64	-	-	-	-
4	26.1	25.53	-	-	-	-
8	38	23.4	-	-	-	-
16	4.7	10.64	-	-	-	-
32	-	6.38	-	-	-	-
≥64	-	2.13	-	-	-	-
Rango	0.06-16	0.5-64	0.016-0.5	<0.03-0.5	0.08-0.25	<0.03-0.5
Media	7.431	8.44	0.101	0.10	0.047	0.047
CIM₅₀	4	4	0.06	0.06	0.03	0.03
CIM₉₀	8	16	0.25	0.125	0.06	0.125

Con respecto a fluconazol, el rango y la distribución de las CIMs es menor cuando se realiza por el sistema colorimétrico que por el método de referencia, (fluconazol, 7.431 vs 8.44 mg/L, $P= 0.08$). Por el método de referencia se ha encontrado un 2.3 % de las cepas que tienen una CIM ≥ 64 mg/L que por el sistema colorimétrico no se detectan.

Las CIM₅₀ fueron iguales para los tres azoles, en cambio hubo diferencias, como mínimo en una dilución, en las CIM₉₀.

Tabla 3: Valores de concordancia (%) entre el sistema colorimétrico y el de referencia para los cinco antifúngicos estudiados frente a las 42 cepas de *C. neoformans*.

Dilución	AMB	FC	FNC	ITZ	Keto
3	92.68	95.24	92.5	85.36	100
2	73.17	88.1	80	70.73	95.1
1	43.90	57.14	72.5	43.90	75.6
0	17.07	16.67	22.5	9.75	24.4

Hasta hace relativamente poco tiempo, el estudio de la sensibilidad *in vitro* de los antifúngicos era problemática porque no había una metodología estandarizada que pudiera reproducir los resultados. Actualmente la normativa dada por la NCCLS documento M27-A, para el estudio de la sensibilidad de *Candida* spp. y *C. neoformans* permiten seguir unas normas en la estandarización y reproductibilidad de la técnica y conseguir unos resultados que puedan predecir la respuesta al tratamiento en las infecciones fúngicas.

En particular, se correlaciona a menudo una CIM alta con un posible fallo terapéutico. (Rex, 1997). De ahí la importancia del estudio de las CIMs, pero la metodología estandarizada (NCCLS, documento M27-A) es compleja para un laboratorio clínico de rutina debido a su laboriosidad técnica. Por ello han aparecido métodos comerciales más simples, pero también estandarizados cuyos resultados son comparables con el de referencia. (Pemán, 1996, Arian, 1997, Espinel-Ingroff, 1999, Posteraro, 2000a).

Sensititre es un sistema para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos de fácil realización y con las diferentes variables experimentales ajustadas a las recomendaciones del documento M27-A de la NCCLS.

En este estudio, se han comparado los resultados obtenidos en *Cryptococcus neoformans* mediante el sistema colorimétrico *Sensititre* y el método de referencia. Es un método que en *Candida* spp. ha mostrado una muy buena reproductibilidad y correlación con los métodos de macrodilución y microdilución. (Pfaller, 1994a). En el trabajo de Pfaller la concordancia entre los dos métodos fue de un 95 % a las 24 horas para 3 antifúngicos, a las 48 horas de un 98 % para anfotericina B y 5-fluorocitosina, pero bajaba a 84 % para fluconazol. Sin embargo este estudio de 600 cepas sólo incluía 4 cepas de *C. neoformans*.

En nuestro trabajo se han estudiado solamente aislados de *C. neoformans*, y el nivel de concordancia entre los dos métodos tomando dos diluciones de diferencia ha sido de 73 % para anfotericina B, 88 % para 5 fluorocitosina, 80 % para fluconazol, 71 % para itraconazol, y 95 % para ketoconazol. A pesar de que los niveles de concordancia para anfotericina B e itraconazol son los más bajos no hay discrepancias mayores entre los resultados de las CIMs halladas por los dos métodos.

En cambio, a pesar de tener una concordancia mayor para el resto de antifúngicos se han encontrado discrepancias: *mayor* para fluconazol (2 %) y *minor* para 5 fluorocitosina (33 %). El sistema colorimétrico parece proporcionar valores más bajos de CIM que el método de referencia.

Se han realizado trabajos similares, como el de Carrillo (1999b) en el que este autor ha estudiado 250 cepas de diferentes especies de levaduras incluidas 32 cepas de *Cryptococcus neoformans* y ha obtenido valores de concordancia del 100% para anfotericina B, 97 % para 5 fluorocitosina, 94 % para fluconazol, 84% para itraconazol y 83% para ketoconazol.

Messer (1996) en un estudio de 98 cepas de *Candida* spp. tiene una concordancia de 93% para 5 fluorocitosina y 83 % para itraconazol.

Tiballi (1995) en un estudio de 97 cepas de *C. albicans* obtiene una

concordancia para fluconazol del 95% mientras que para itraconazol es del 77%.

En estos estudios los valores de concordancia son mayores que los obtenidos en nuestro trabajo, pero en ellos se han incluido mayoritariamente diferentes especies de *Candida* spp además de *C. neoformans*.

La inclusión del colorante azul de Alamar permite una lectura más fácil de los puntos de corte sobre todo para los azoles, aunque en *C. neoformans* la lectura no es tan problemática como en *Candida* spp.

En nuestro trabajo, hay una excelente sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos ensayados, aunque hay un 33 % de cepas con CIMs ≥ 8 mg /L para 5 fluorocitosina y un 8% de cepas con CIMs ≥ 32 mg/L para fluconazol que se detectaron solamente por el método de referencia.

En conclusión, la comercialización de métodos de sencilla y rápida realización como el sistema *Sensititre* que tiene una adecuada estandarización de las variables metodológicas, puede ser útil para el trabajo de rutina del laboratorio clínico, sobre todo cuando se estudian diferentes cepas de *Candida* spp donde la concordancia de los dos métodos es mayor. Sin embargo, con las cepas de *C. neoformans* estudiadas, la distribución de las CIMs para 5 fluorocitosina y fluconazol se han observado discrepancias que podrían dificultar la orientación del tratamiento.

Este trabajo se ha podido realizar gracias a una beca del Fondo de Investigaciones Sanitaria 98/ 0374 del Ministerio de Sanidad.

OBJETIVO 7

Valoración del estudio *in vitro* de sensibilidad a nuevos antifúngicos para conocer su actividad sobre *Cryptococcus neoformans*.

Artículo V: *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* serotypes to GM 237354 derivative of the sordarin class.

Mycoses : 2002 (en prensa).

La incidencia de infecciones invasivas fúngicas se ha incrementado de forma alarmante en la última década (Groll, 1995), y se debe al aumento del número de personas con alteraciones inmunológicas, como los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, los que reciben trasplante de órganos o de médula ósea, pacientes con tratamiento quimioterápico, por corticosteroides, y el empleo generalizado de técnicas terapéuticas con catéteres, sondas, prótesis, etc.

Debido al incremento de las infecciones fúngicas se ha desarrollado la investigación de nuevas moléculas para hallar preparados más efectivos y a su vez menos tóxicos que los existentes (Groll, 1997) y evitar la selección de cepas resistentes. (Perfect, 1990). Estos agentes nuevos se intenta además que tengan un amplio espectro de actividad.

El tratamiento de las infecciones sistémicas, a pesar de que ya han pasado más de 4 décadas desde su introducción, es la anfotericina B, asociada o no a la 5-fluorocitosina. En la década de 1980 con la aparición de los triazoles se dió una alternativa terapéutica a estas graves infecciones.

Los estudios para encontrar agentes antifúngicos con un amplio espectro y propiedades farmacocinéticas favorables han continuado, y se han desarrollado nuevos compuestos cuya eficacia debe ser estudiada.

Algunos de estos nuevos antifúngicos son:

Las formulaciones lipídicas de anfotericina B y nistatina:

Los derivados poliénicos son sustancias que derivan de diversas especies de *Streptomyces*. Los dos compuestos más representativos de este grupo de antifúngicos son la anfotericina B y la nistatina.

La anfotericina B (i/v) sigue siendo el antifúngico de elección para el tratamiento de las micosis sistémicas. Tiene un efecto fungicida, y se ha demostrado efecto sinérgico al asociarla con 5-fluorocitosina para el tratamiento de la criptococosis.

Es una molécula insoluble en agua, por lo que se utiliza desoxicolato para su administración intravenosa. Tiene un amplio espectro de acción.

A pesar de su eficacia probada es un antifúngico con una elevada tasa de efectos adversos, principalmente la toxicidad renal, por lo que es necesario monitorizar siempre al paciente.

Se han desarrollado nuevas formulaciones de administración, asociadas a lípidos, que parece que reducen la nefrotoxicidad.

- El primer producto en desarrollarse fué **la anfotericina B liposomal**, (AMB-L) *AmBisome*® en 1991, la molécula de anfotericina B se rodea de capas de fosfolípidos de unos 50 nm de diámetro compuestas por fosfatidilcolina, colesterol y distearoil-fosfatidil-glicerol.

El antifúngico queda dispuesto en forma de microvesículas y es transportado sin que se altere su actividad. Se ha comprobado que a las pocas horas de su administración parenteral se ha distribuido el producto a los tejidos. El espectro de acción es similar a la anfotericina B

convencional, pero su indicación viene dada por la mayor acumulación en zonas orgánicas determinadas como tejido hepático, pulmonar o renal, y la posibilidad de administrar dosis superiores a la anfotericina B. Se ha comprobado que tiene menos efectos adversos. El problema es su elevado coste económico.

- **Anfotericina B, en complejo lipídico (ABLC), Abelcet[®]**, comercializada en 1995, consiste en la unión de la anfotericina B a dos diferentes fosfolípidos “building blocks” (Swenson, 1998). La anfotericina B se libera por acción de fosfolipasas celulares, que permite una rápida difusión por el sistema retículoendotelial y una mayor rapidez de eliminación. Tiene menor nefrotoxicidad que la anfotericina B convencional.
- **Anfotericina B, en dispersión coloidal, (ABCD) Amphocil[®], Amphotec^R**, no comercializada en España, consiste en una formulación en concentración equimolar 1:1 con sulfato de colesterol. En estudios en pacientes hematológicos y con candidemia se demostró eficaz. (Noskin, 1998) y también en la criptococosis sistémica. (Clemons, 1998, Diamond, 1998).
- **Nistatina Liposomal**
Nistatina se descubrió a principios de 1950_s como el primer antifúngico poliénico. Está producido por estreptomicetos. *In vitro* presenta un amplio espectro de acción, pero tiene marcados problemas de solubilización y una alta toxicidad cuando se administra por vía parenteral. De ahí su exclusión para tratamientos sistémicos.

La Nistatina liposomal se ha desarrollado para su utilización en micosis invasivas y gracias a la incorporación de la molécula dentro de un liposoma, se protege a los eritrocitos humanos de su toxicidad y su administración se puede realizar por vía parenteral a diferencia de la nistatina clásica. (Carrillo, 1999c).

Compuestos azólicos

Son moléculas sintéticas con anillos de 5 elementos, heteropentacíclicos que contienen dos átomos de nitrógeno (imidazoles) ó tres (triazoles).

Presentan un amplio espectro de actividad. Actúan sobre el citocromo P-450 con inhibición de la enzima lanosterol y se impide la síntesis de ergosterol, componente principal de la membrana plasmática del hongo. Su efecto es fungistático.

La aparición de los derivados azólicos incrementó el potencial de antifúngicos para el tratamiento de las infecciones por hongos. Se ha comprobado, sin embargo la aparición de resistencias a dichos compuestos sobre todo al fluconazol tan en uso desde la aparición del SIDA. (Newmann, 1994). Se continua en la investigación de nuevos derivados azólicos que actúen sobre la síntesis del ergosterol.

- **Tercera generación de triazoles** con un amplio espectro de acción. En este grupo se encuentra Voriconazol (UK 109,496). Este antifúngico deriva de una modificación sintética de la estructura del fluconazol. Al igual que otros triazoles, actúa inhibiendo el citocromo P-450 dependiente de 14 α lanosterol demetilasa y resulta la depleción del ergosterol y la acumulación de esteroides tóxicos en la pared de los hongos. Voriconazol es activo a menor concentración *in vitro* que fluconazol y actúa sobre la mayoría de levaduras incluida *C. neoformans* y también sobre *Aspergillus* (McGinnis, 1997). Tiene acción fungicida.

Otros azoles en estudio son el ER-30346, D-0870 derivados del fluconazol, el SCH-56592 derivado del itraconazol (Espinel-Ingroff, 1998b, Perfect, 1996), eberconazol nuevo imidazólico (Torres-Rodríguez, 1999).

Equinocandinas y pneumocandinas

Las equinocandinas fueron originalmente descubiertas en los años 1970 en programas de fermentación de metabolitos fúngicos para nuevos antibióticos. Están estrechamente relacionadas con las pneumocandinas.

Son lipopéptidos compuestos por un hexapéptido cíclico de aminoácidos con uno o varios grupos alcohólicos y con un radical ácido graso variable.

El mecanismo de acción es común en esta familia . Rompe la estructura de la pared de la célula produciendo una inestabilidad osmótica. Hay una inhibición del complejo enzimático (1,3)- β -D-glucano sintetasa que forma los polímeros de glucano, que es el componente mayor de la pared de la célula de la mayoría de los hongos.

Hay una gran variedad de compuestos en esta familia que están en estudio, equinocandinas B, C y D, LY-303366 (Espinel-Ingroff, 1998b, Zhanel, 1997), pneumocandina L-743,872 (Del Poeta, 1997).

Pradimicinas y benanomicinas

Son estructuralmente muy similares y constituyen una nueva clase de antifúngicos que se aíslan de filtrados de cultivos de *Actinomycetes* (Oki,1988). Pertenecen al grupo de los *Benzo-(α)-naftacenoquinonas*.

La estructura química se caracteriza por el esqueleto de la benzo-(α)-naftacenoquinona a la que se añade una cadena lateral de un D-aminoácido y un disacárido.

En presencia de ión calcio se unen a los mananos de la pared y dañan la integridad de la membrana de la célula fúngica produciéndose la muerte

celular. Tienen un amplio espectro de acción incluyendo a *Candida* spp, *C. neoformans*, *Aspergillus* spp, dematiáceos y dermatofitos. (Watanabe, 1996, Karlowsky 1997).

Las pradimicinas han demostrado tener una potente actividad en modelos animales de candidiasis, criptococosis y aspergilosis sistémica. (Walsh, 1997). Sin embargo parece ser que puedan tener acción hepatotóxica.

Dentro de las benanomicinas , la benanomicina A es la que tiene mayor actividad experimental en infecciones sistémicas por *C. albicans*, *C. neoformans* y *A. fumigatus*. (Ohtsuka, 1997).

Sordarinas

Comprenden una familia de sustancias que actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas de la célula fúngica.

Hay diferentes sustancias en estudio dentro de esta familia de sordarinas, GM 193663, GM 2116676, GM 222712 y GM 237354 (Dominguez, 1998).

Inhiben el factor de elongación (EF-2) que cataliza la síntesis de proteínas de la célula fúngica, y parece ser que no actúan sobre las células animales. Hay algunas cepas que presentan resistencia intrínseca a estas sustancias. Por estudios *in vitro* parece que tienen un amplio espectro de acción como por ejemplo frente a *Candida* spp, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *P. carinii*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, pero no frente a *Aspergillus*.

El compuesto derivado de tetrahidrofurano GM 237354 se ha obtenido de caldos de cultivo del hongo *Graphium putredinis*. Muestra un amplio espectro de acción y una buena farmacodinámica. Es fungicida.

En el trabajo que se presenta se ha querido analizar la acción del sordarin

GM 237354 sobre 190 cepas clínicas de *C. neoformans* y comparar las CIMs obtenidas con las de la anfotericina B.

Cepas estudiadas

Se han incluido en este estudio 190 cepas clínicas de *C. neoformans*. La mayoría de las cepas se habían aislado de pacientes VIH positivos con criptococosis de diferentes países, 117 cepas fueron aisladas en España, 29 procedían de Argentina, 22 de Brasil y 22 de Cuba.

En el estudio se añadieron cinco cepas de referencia como control de calidad de la técnica: *Candida albicans*, (ATCC 90028), *Candida krusei*, (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), y *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112 y RVB 20128).

Estas cepas se incluyeron en cada prueba de sensibilidad realizada.

Se estudiaron los serotipos de todas las cepas (Baró, 1999). De las 190 cepas, 175 correspondieron a la variedad *neoformans* (serotipo A 72%, serotipo D 11.5 %, serotipo AD 8.5%) y 15 a la variedad *gattii* (serotipo B 8%).

Antifúngicos

Anfotericina B en polvo fue obtenida de los laboratorios Squibb (Esplugues de Llobregat, Barcelona, España) y el derivado sordarínico GM 237354 de GlaxoWellcome S.A. (Tres Cantos, Madrid, España). La solución stock para Anfotericina B se realizó solubilizando el antifúngico con dimetil sulfóxido (DMSO) y el producto GM 237354 con agua destilada, a una concentración 100 veces más concentrada que la dilución de trabajo. (1.6 mg/ml para ambos antifúngicos).

Estudio de la sensibilidad

Todas las cepas se cultivaron en placa de agar Sabouraud glucosado durante 24 horas para *Candida* spp, y 48 horas para *C. neoformans*.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron atendiendo las normas dictadas en el documento M27-A del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.

El medio de cultivo utilizado ha sido el medio de RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato al que se le ha añadido un 2 % de glucosa y se ha tamponado a pH 7 con MOPS.

La concentración inhibitoria mínima se definió para GM 237354 como la menor concentración de antifúngico en la que se observa una disminución del crecimiento del 95% cuando se compara con el pocillo control. Para anfotericina B debe ser del 100 %.

Tabla 1: Actividad *in vitro* de anfotericina B y GM 237354 frente a 190 cepas clínicas de *C. neoformans* :

Antifúngico	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	Rango	Media (DS)	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Anfotericina B	≤ 0.03 -1	0.11 (0.17)	0.125	0.5
GM 237354	0.03-2	0.56 (0.37)	0.5	1

Las cepas control estaban dentro del rango de valores admitidos por la NCCLS.

Cinco cepas mostraron CIMs de 2 $\mu\text{g/ml}$ para el compuesto GM 237354, en cambio ninguna cepa muestra este valor para anfotericina B.

Tabla 2: Distribución de las CIMs de GM 237354 frente a las 190 cepas de *C. neoformans* con respecto a los serotipos.

Serotipos	Nº cepas	Rango	Media (DS)	CIM ₅₀	CIM ₉₀
A	137	0.03-2	0.537 (18.6)	0.5	1
D	22	0.06-2	0.587 (3.3)	0.5	1
AD	16	0.25-1	0.5 (4.1)	0.5	1
B	15	0.5-2	0.833 (3.5)	1	1

El análisis estadístico mostró que hay diferencias significativas entre los serotipos A y AD con respecto al serotipo B ($P = 0.0475$ y $P = 0.022$ respectivamente). *C. neoformans* var. *gattii* tiene valores de CIMs más altas que el resto de serotipos. Estos datos deberían comprobarse con un mayor número de cepas del serotipo B.

No se han encontrado diferencias significativas con respecto al origen geográfico de las cepas.

Se han realizado considerables avances en el desarrollo de drogas antifúngicas de uso sistémico en los últimos años, con un gran potencial farmacológico y amplio espectro de acción *in vitro*, pero pendientes la mayoría de evaluación de la eficacia *in vivo*.

El uso de la anfotericina B sólo o acompañada de la 5 fluorocitosina es todavía el tratamiento de elección de la criptococosis en la mayoría de los casos a pesar de la nefrotoxicidad que ocasiona el tratamiento con anfotericina B.

Es por esto que continúa la búsqueda de nuevas formulaciones de moléculas como es el caso de los derivados del sordarín. (Gomez-Lorenzo, 1998). Este producto se ha comprobado que tiene una alta eficacia frente a *Pneumocystis carinii* y algunos hongos dimórficos, además de *Candida* spp. (Herrerros, 1998, Cuevas, 1998). Prácticamente no se han realizado

estudios sobre la actividad de la molécula GM 237354 y *C. neoformans*. Tan solo hay un estudio con 20 cepas, pero sin mencionar el origen y el serotipo de dichas cepas (Herrerros,1998).

En nuestro estudio, todos los aislados de *C. neoformans* mostraron valores inferiores o igual a 1 $\mu\text{g/ml}$ para anfotericina B, y con una CIM₉₀ del de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, lo que se confirma la incidencia muy baja de resistencia a este polieno para esta levadura.

Respecto a los resultados obtenidos con el compuesto GM 237354 se han hallado 5 cepas con valores de 2 $\mu\text{g/ml}$, y una CIM₉₀ de las cepas de 1 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados son más altos que los hallados para anfotericina B y en el trabajo previo (Herrerros, 1998) en el que el rango de las CIMs era de 0.015-0.25 $\mu\text{g/ml}$ y una CIM₉₀ de 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Estas diferencias en los resultados de la sensibilidad seguramente son debidas al mayor número de cepas incluidas en nuestro estudio y a la diversidad del origen geográfico y los serotipos de los aislados. El medio de cultivo también podría influir ya que Herrerros y col. usaron el medio de yeast nitrogen base y en nuestro estudio el medio de RPMI 1640.

Los estudios de sensibilidad deberían relacionar las diferentes variedades y serotipos de *C. neoformans* ya que se ha demostrado que tienen diferente ecología y patogenicidad. Datos clínicos indican que los pacientes infectados con *C. neoformans* var. *gattii* pueden mostrar síntomas y respuestas a la terapia antifúngica que difieren de aquellos mostrados por pacientes infectados por los serotipos A y D. (Franzot, 1998, Peachey, 1998).

Los datos obtenidos en nuestro estudio indican que las CIMs para GM 237354 son más altas en las cepas del serotipo B que en las cepas con

serotipo A y AD. Esta tendencia debería ser confirmada con un mayor número de cepas de *C. neoformans* serotipo B.

También deberían realizarse estudios para comprobar su eficacia en modelos animales antes de su posible uso clínico en humanos.

Este trabajo se ha podido realizar gracias a una beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) 96/ 1991-01 del Ministerio de Sanidad.

OBJETIVO 8

Poner a punto una técnica de “Random Amplification of Polymorphic DNA” (RAPD) para poder caracterizar grupos de cepas seleccionados. Se pretende conocer si las cepas de un brote epidémico podrían tener un origen común.

Carta al Director:

Artículo: Caracterización molecular de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* causante de brotes epidémicos de criptococosis en cabras.

Revista Iberoamericana de Micología, 1999; 16: 164-165.

En los laboratorios clínicos de rutina, la discriminación de las dos variedades de *C. neoformans* se realiza subcultivando las cepas en diferentes medios diferenciales como el medio de canavanina-azul de bromotimol (CGB) o usando discos impregnados con aminoácidos.

La diferente composición del polisacárido capsular es la responsable de las reacciones antigénicas y se han podido diferenciar 5 serotipos A,D, AD, B y C. (Ikeda, 1982).

Recientemente, se han desarrollado métodos moleculares más sensibles (Dromer, 1994, Varma, 1995, Posteraro, 2000b) y muy útiles sobre todo para estudios epidemiológicos de las infecciones fúngicas y de la patogenicidad de los hongos (Brandt, 1995, Garcia-Hermoso, 1997).

Es necesario disponer de técnicas de tipado molecular con poder discriminatorio y que sean reproducibles aunque todavía no existe un consenso sobre cual es el mejor método de tipaje molecular ya que cada técnica tiene sus ventajas e inconvenientes.

Estos métodos se basan en la amplificación de ácidos nucleicos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La característica fundamental de la PCR es la capacidad de tener una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN que después pueden ser analizadas.

El método que se ha puesto a punto en este trabajo ha sido la técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que fué descrita por Williams et al (1990). Esta técnica permite la amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos elegidos al azar, y los productos que se obtienen dependen de las condiciones en que se ha realizado la reacción, temperaturas, longitud del cebador utilizado.

Esta técnica es relativamente rápida de realizar y no muy cara. El mayor problema es que los datos son difíciles de reproducir de un laboratorio a otro ya que los resultados dependen del material utilizado y de las condiciones de amplificación. Es difícil decir qué protocolo será el mejor ya que en la mayoría de trabajos publicados se utilizan condiciones de amplificación, cebadores y cepas diferentes.(Sorrell, 1996a, Viviani, 1997, García-Hermoso,1999).

Los pasos que hay que realizar son la extracción del ADN, amplificación del mismo con cebadores cortos de secuencia de dinucleótidos arbitrarias y resolución de los productos amplificados mediante electroforesis. Se obtiene un número de bandas de diferentes pesos moleculares que son específicas para cada cebador empleado.

El objetivo del estudio, ha sido caracterizar genotípicamente mediante la técnica del Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), las cepas de *C. neoformans* var *gattii* aisladas de 5 brotes epidémicos en diferentes rebaños de cabras en la provincia de Cáceres.

Cepas estudiadas

Se han estudiado 13 cepas de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B aisladas de 6 cabras cuya procedencia eran diferentes zonas de pastoreo de la provincia de Cáceres. El período de aislamiento fue entre 1990 y 1994.

Se ha utilizado como cepa control en cada gel, la cepa RV 20185 *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B.

Tabla 1: Se muestran las cepas de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B aisladas de 6 cabras según su origen geográfico.

Animal	Cepas	Muestra	Procedencia
1	48 A	Pulmón	Pescueza
1	49 A	Pulmón	Pescueza
2	50 A	Pulmón	Serradilla
2	60 A	Pulmón	Serradilla
3	51 A	Higado	Casas Millán
3	52 A	Encéfalo	Casas Millán
4	58 A	Pulmón	Madroñera
4	59 A	Pulmón	Madroñera
5	56 A	Intestino	Vera
6	53 A	Pulmón	Vera
6	54 A	Pulmón	Vera
6	55 A	Pulmón	Vera
6	57 A	Pulmón	Vera

Extracción de ADN

Existen diferentes métodos para la extracción del ADN de *Cryptococcus neoformans* (Wen, 1996, Löffler, 1997), pero se ha seguido la técnica de Lehman (1992), para realizar la extracción de ADN. Para ello se han cultivado las levaduras en placas de Sabouraud durante 48 horas.

-
- Se recogieron las células en tubos de Eppendorff y se lavaron 2 veces con agua destilada estéril.
 - Se resuspendieron en 200 μ l de tampón de extracción: se mezclaron 20ml Tritón X100 (Sigma) con 10 g de SDS (dodecilsulfato de sodio) (Merck) en 1 litro de tampón Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA 1mM (Sigma) (concentraciones finales) y ClNa 100 mM.
 - Se añadieron 200 μ l de fenol:cloroformo:isoamiloalcohol (25:24:1, vol/vol/vol)
 - A cada tubo de eppendorff se añadió aproximadamente 0.3 g de bolas de vidrio estériles.
 - Se mezclaron con un vortex durante unos 30 seg. repitiendo este proceso 6 veces. Se mantuvieron las células en hielo entre una agitación y la siguiente.
 - Se añadieron 200 μ l de TE : Tampón Tris-HCl (pH8) 10 mM, Na₂EDTA 1mM). Se mezcló bien con el vortex.
 - La mezcla se centrifugó a 13000xg durante 5 min. Se recogió el sobrenadante acuoso con cuidado de no llevarse restos celulares y se traspasó a otro tubo de Eppendorff.
 - Se añadieron 200 μ l de fenol:cloroformo:isoamiloalcohol (Sigma) se mezcló, se centrifugó y se repitió el proceso hasta que no se distinguiera ninguna interfase fenol-acuosa. La fenolización sirve para la extracción de las proteínas.
 - El último sobrenadante se mezcló con 1 ml de etanol. Se incubó 1h. a –70°C ó toda la noche a –20°C. Se centrifugó a 13000xg unos 10 min a 4°C para precipitar los ácidos nucleicos. Se procedió a decantar el sobrenadante.
 - El precipitado fue resuspendido con 370 μ l de tampón TE y 30 μ l de Rnasa (Sigma) para liberar el ADN del ARN. Se incubó durante 1 h. a 37°C.
 - Se añadió 1 ml de etanol al 100% a 4°C agitando el tubo para que se homogenizara bien la mezcla. Se realizó una incubación de 1 h a –70°C ó toda la noche a -20°C.
-

- Se realizó una centrifugación de 10-20 min a 13000xg a 4°C y se decantó el sobrenadante.
- Se procedió al secado del ADN al vacío .
- Se resuspendió el ADN en 40 µl de tampón TE y se procedió a su medición.
- Con una alícuota se determinó la pureza y la concentración del ADN mediante un espectrofotómetro (Netheler, 22331, Hamburgo) que calcula la relación de absorbancias a 260 y 280 nm. Una ratio de 1.8 a 2.1 se considera aceptable la relación entre la cantidad de ADN purificado y las proteínas de la muestra.

La concentración de ADN se estimó realizando una electroforesis de 2 µl de la muestra en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Técnica de RAPD

1- Amplificación del ADN.

2- Se han utilizado 4 cebadores, los dos últimos de forma simultánea (Gibco BRL, Lifetechnology)

CN1 (5'TACCCCGCCCATATTCCAT3')

5SOR (5' ATGGGAATACGACGTGCTGTAG3')

C1 (5' ACGGTACACT3')

C2 (5' GTTTCCGCCCC3')

3- Las PCRs se realizaron en un volumen final de 25µl que contiene aproximadamente 10 ng de ADN. Se usó el sistema Ready to Go RAPD Analysis Beads (Amersham Pharmacia biotech), que contiene polimerasas termoestables (AmpliTaq DNA polymerase y Stoffel fragment), dNTPs (0.4 mM cada dNTP), BSA (2.5 µg), tampón (3 mM MgCl₂, 30 mM KCl y 10 mM Tris, pH 8.3).

4- La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Perkin Elmer Cetus 2400.

- Desnaturalización inicial: 1 ciclo de 4 min a 94°C.
- Amplificación : 40 ciclos
 - Desnaturalización: 1 min a 94°C
 - Hibridación de los cebadores: 1 min a 36°C.
 - Extensión: 2 min a 72°C
- Extensión final: 1 ciclo de 10 min a 72°C y 30 seg a 36°C.
- Productos de amplificación: se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio (10 mg/ml).
- Se usó como marcador molecular el patrón de 100 pb (Pharmacia)

Para el análisis de los patrones se tuvieron en cuenta las bandas que se leían con claridad, independientemente de su intensidad.

Las imágenes fueron procesadas en el sistema computarizado Diversity Database, GEL DOC 1000, Molecular Analysis (Bio-Rad Laboratories, California, USA).

Las cepas con idéntico perfil electroforético para cada cebador fueron agrupadas en un mismo patrón, que se definieron con letras del alfabeto arbitrariamente.

La reproductibilidad de la técnica se ha confirmado amplificando el ADN de un mismo organismo en tres ocasiones diferentes. Los fragmentos de dudosa interpretación no fueron asumidos como elementos de discriminación de los patrones.(Sorrell, 1996a).

Figura 1: Se muestran los perfiles obtenidos con la técnica del RAPD de las 13 cepas de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B por amplificación con el cebador CN1.

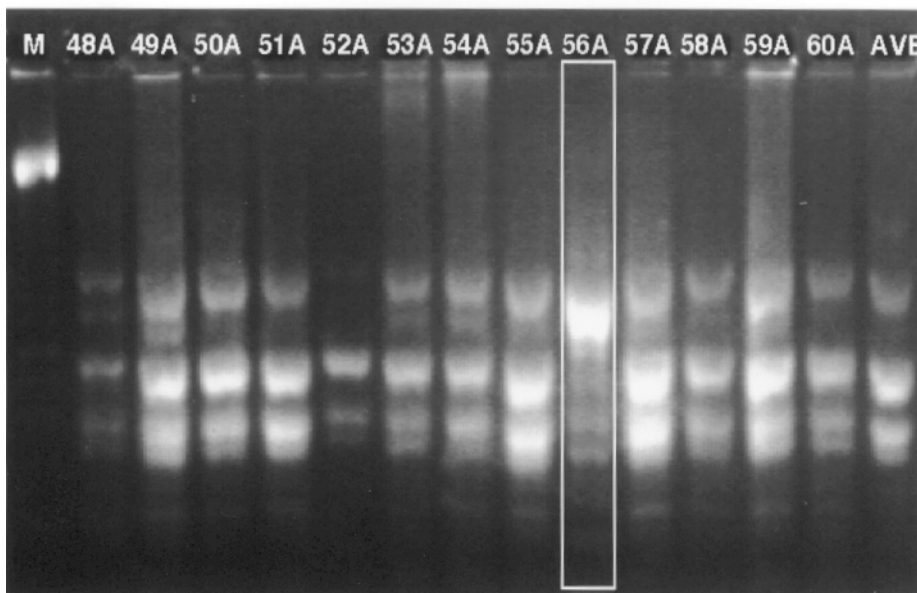


Figura 2: Se muestran los perfiles obtenidos con la técnica del RAPD de las 13 cepas de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B por amplificación con el cebador 5-SOR.

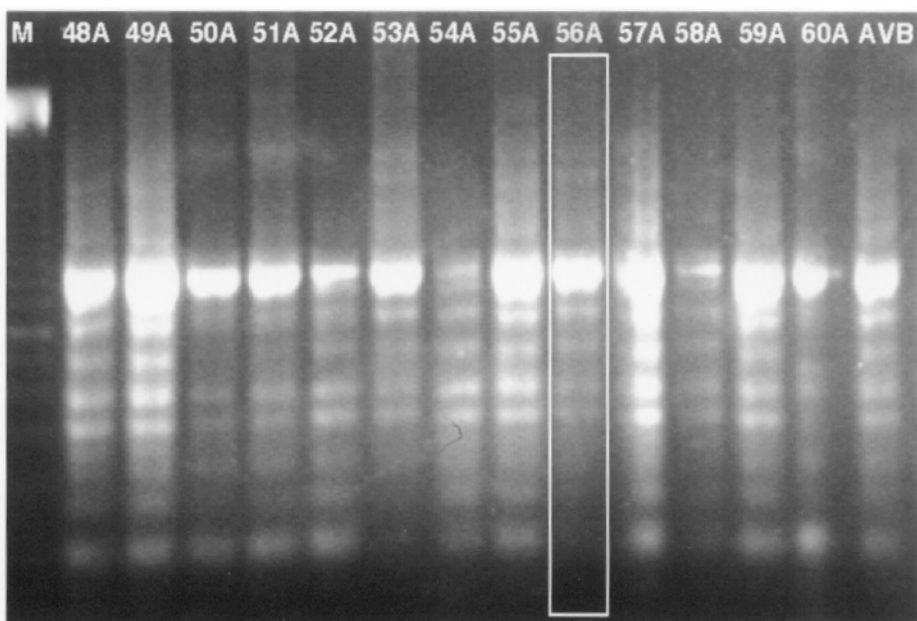


Figura 3: Se muestran los perfiles obtenidos con la técnica del RAPD de las 13 cepas de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B por amplificación con los cebadores C1 y C2 simultáneamente.

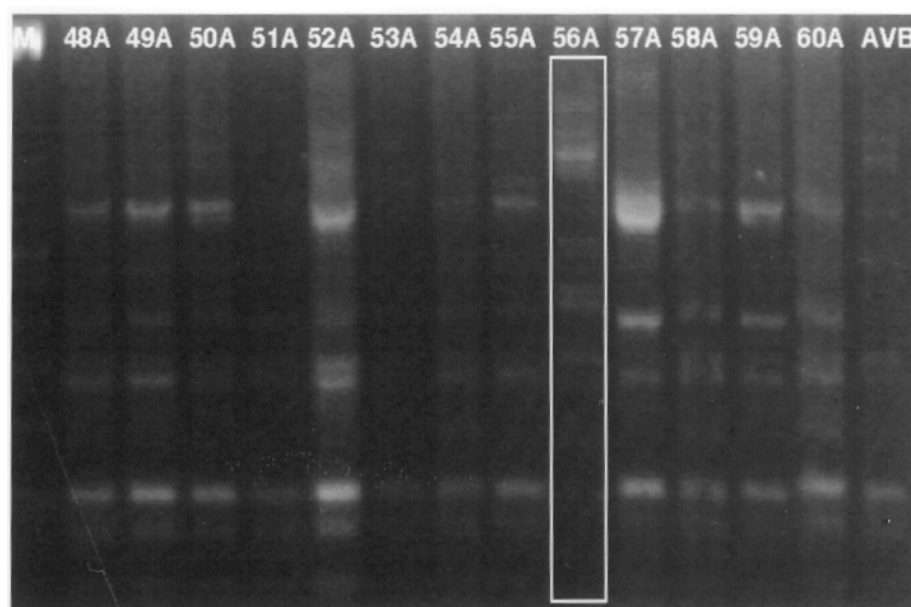


Tabla 2: Patrones obtenidos por la técnica del RAPD de las 13 cepas estudiadas.

Animal	Cepa	Cebador			Patrón
		CN1	5SOR	C1+C3	
1	48 A	III	I	VI	A
1	49 A	III	I	VI	A
2	50 A	III	I	VI	A
2	60 A	III	I	VI	A
3	51 A	III	I	VI	A
3	52 A	III	I	VI	A
4	58 A	III	I	VI	A
4	59 A	III	I	VI	A
5	56 A	IV	II	V	B
6	53 A	III	I	VI	A
6	54 A	III	I	VI	A
6	55 A	III	I	VI	A
6	57 A	III	I	VI	A

Los resultados obtenidos mediante el análisis de imagen han permitido agrupar las 13 cepas de *C. neoformans* var *gattii* en dos diferentes patrones genotípicos denominados A y B.

El patrón genómico A, se ha encontrado en todos los brotes independientemente de la zona, sin embargo en la localidad de Vera de donde se disponía de muestras de dos animales se ha encontrado un segundo patrón B.

Estos datos parece que sugieren que con la metodología utilizada, se ha podido demostrar que en una misma zona geográfica coexisten dos patrones diferentes de *C. neoformans* var *gattii* y que éstos han infectado a dos animales diferentes. El patrón A sin embargo ha sido el dominante ya que se ha hallado en todas las áreas geográficas estudiadas.

No se ha podido conocer todavía el nicho ecológico de *C. neoformans* var *gattii*, en las diferentes zonas de la provincia de Cáceres, pero se puede concluir que los agentes causales de los 5 brotes epidémicos de criptococosis en cabras han sido producidos como mínimo por 2 cepas de *C. neoformans* var *gattii* ya que presentan patrones genotípicos diferentes.

Estas cepas han sido incluidas en un estudio multicéntrico realizado por Boekhout y col (2001) en el que se quiere demostrar que hay una gran divergencia genética entre las variedades *C. neoformans* var *neoformans* y *C. neoformans* var *grubii* por una parte y por otra éstas con *C. neoformans* var *gattii*. Este autor utilizó la técnica de “amplified fragment length polymorphism (AFPL)” para investigar la estructura y las relaciones epidemiológicas de un grupo de cepas de *Cryptococcus* aisladas de diferentes zonas del mundo. Los aislamientos de las cabras hispánicas ocurrieron en el cluster 4 que contiene los aislados del serotipo B. Se separaron dos subclusters 4A y 4B que correspondieron a diferentes zonas geográficas. Los aislamientos de cabras españolas ocurrieron en el cluster 4 A junto con un número de aislados clínicos y un aislamiento de restos de *Eucalyptus* de un zoo de California.

El análisis por la técnica del RAPD es bastante rápida y simple de realizar,

si la comparamos con la mayoría de técnicas usadas en biología molecular. (Olive, 1999).

Para un determinado ADN, cada cebador genera un característico y repetitivo patrón de fragmentos de ADN. (Williams, 1990). Además cuando los ADNs de las diferentes cepas de las mismas especies se analizan por la técnica del RAPD con el mismo cebador muestran un alto grado de similitud. (Aoki, 1999).

En contrapartida es una técnica con una reproductibilidad moderada intralaboratorio y baja interlaboratorio donde las condiciones pueden ser algo diferentes (Olive, 1999). El proceso de amplificación es extremadamente sensible a leves cambios en la temperatura y esto puede conducir a la variabilidad en los patrones de las bandas. (Welsh, 1990) y a una difícil estandarización de la técnica.

Es un método que puede usarse en estudios epidemiológicos, (Sorrell, 1996b, Yamamoto, 1995, García-Hermoso, 1999) ya que puede discriminar entre diferentes cepas. (Chen, 1996b)

Sin embargo, es difícil conocer el origen de la infección y la ruta de transmisión. (Currie, 1994).

Debido al incremento de infecciones nosocomiales por *Candida albicans* y otros hongos es muy importante tener un método rápido y sencillo para la tipificación de las cepas fúngicas clínicas. Este método podría además estudiar brotes epidémicos y la incidencia de la transmisión persona a persona. (Haynes, 1995).

En nuestro estudio se ha podido agrupar las cepas con idéntico perfil electroforético para cada cebador en dos patrones genotípicos diferentes A y B. Hay un patrón dominante, el A, que coexiste con otro tipo genómico en la

misma área. No se ha determinado todavía el nicho ecológico de *C. neoformans* var *gattii* serotipo B en la naturaleza del área de Cáceres para saber si existe un reservorio de dicha especie.

APLICACIÓN PRACTICA

Siguiendo la misma metodología del random amplification of polymorphic DNA (Haynes, 1995) se ha realizado un trabajo (pendiente de publicación), en el cual se evalúa la capacidad de esta técnica de discriminar entre diferentes cepas clínicas aisladas en un mismo paciente. Este trabajo se va ampliando a medida que se obtienen diferentes aislamientos de un mismo paciente.

Se han estudiado 7 aislamientos de 3 pacientes infectados por el VIH con criptococosis que estaban ingresados en el Hospital del Mar de Barcelona. Estas cepas se aislaron de muestras de hemocultivos y LCR.

Tabla 1: Origen de los aislamientos, serotipos de las cepas y tiempo transcurrido entre un aislamiento y otro de las cepas de *C. neoformans* de los 3 pacientes con criptococosis:

Pacientes Nº	Cepa Nº	Origen	Serotipo	Tiempo *
1	12C	LCR	D	3
	14C	LCR**	A	
	14C	HC**	A	
2	15C	LCR	A	5
	15C	HC	A	
3	16C	LCR	A	2
	16C	HC	A	

* Días transcurridos entre los diferentes aislamientos.

**Aislamiento simultáneo.

Técnica de RAPD

- Para la extracción del ADN y la realización de las PCRs se ha usado la misma metodología descrita en el trabajo anterior.
- Se han utilizado 3 cebadores de 20 a 22 pares de bases.

CN1 (5'TACCCCGCCCATATTCCAT 3')

5SOR (5' ATGGGAATACGACGTGCTGTAG 3')

MYC1 (5' GAGGAAGGTGGGGATGACGT 3')

Los cebadores se han usado en parejas (5SOR/MYC1), (5SOR/CN1).

La temperatura de desnaturalización ha sido de 93°C durante 3 min, la amplificación de baja astringencia (10 ciclos a 35°C, 72°C y 93°C, cada uno durante 1 min) seguido de una amplificación de alta astringencia (20 ciclos a 55°C, 72°C y 93°C cada uno durante 1 min).

Estos parámetros se cambiaron para la combinación de cebadores 5SOR/CN1 que incluye una temperatura de amplificación de 40°C en los primeros 10 ciclos y 20 ciclos de amplificación de alta astringencia a 55°C.

La reproductibilidad del método fué valorada por amplificación del ADN en 3 diferentes ocasiones.

Las cepas de Referencia de *C neoformans* fueron RVA 56164 serotipo A, RVD 68038 serotipo D . Se añadieron el estudio dos cepas clínicas 20C serotipo A y 38C serotipo D.

Los resultados se analizaron mediante el uso del programa Diversity Database (BioRad).

Figura 1: se muestran las bandas de amplificación mediante la técnica del

RAPD con la pareja de cebadores 5SOR/ CN1

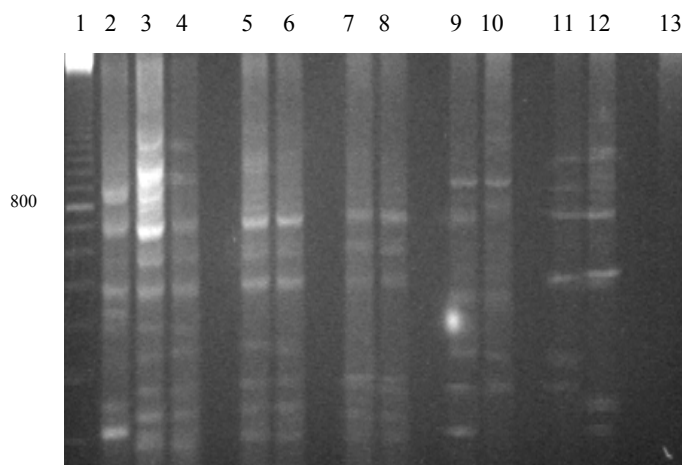
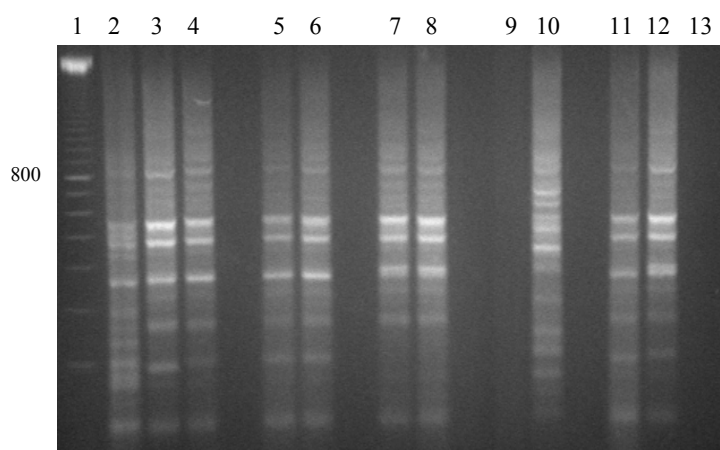


Figura 2: se muestran las bandas de amplificación mediante la técnica del RAPD con la pareja de cebadores 5SOR/ MYC1.



Línea 1, marcador de pesos moleculares (100 pares de bases), línea 2 (12C, LCR), línea 3 (14C, Hc), Línea 4 (14C, LCR), línea 5 (15C, Hc), Línea 6 (15C, LCR), línea 7 (16C, Hc), Línea 8 (16C, LCR), línea 9 (38C, D), Línea 10 (20C, A), línea 11 (RVA), Línea 12 (RVD), línea 13 (Control Neg.),

Figura 3: Dendograma generado por los patrones de 5SOR/ CN1

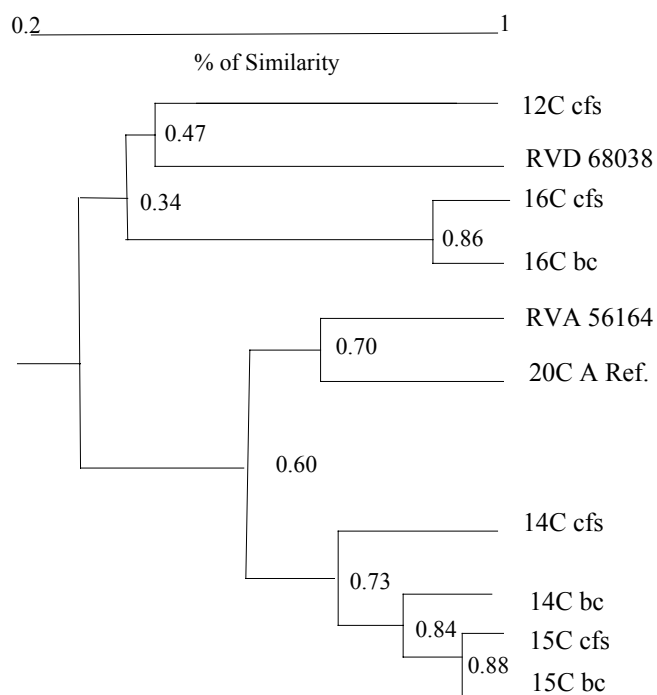
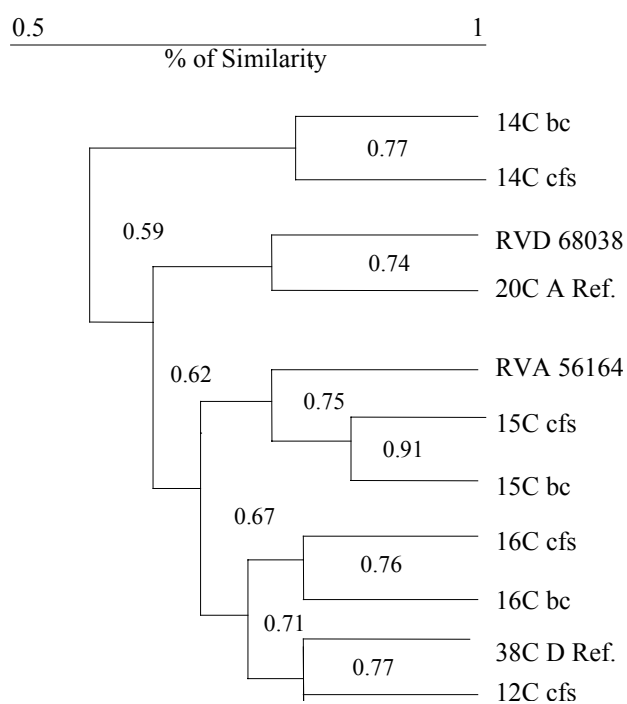


Figura 4: Dendrograma generado por los patrones de 5SOR/ MYC1.



El paciente 1 mostró dos perfiles que correspondían al *Patrón I* para los

aislados de *C. neoformans* serotipo A y *Patrón II* para el aislamiento del serotipo D con el cebador 5SOR/ MYC1.

Los pacientes 2 y 3 que tenían una pareja de aislamientos de un mismo episodio de criptococosis fueron genotípicamente indistinguibles. en ambas combinaciones de cebadores.

La técnica del RAPD es relativamente simple y permite la discriminación de diferentes especies de levaduras (Lehmann, 1992). Ha sido utilizada en estudios epidemiológicos de *C. neoformans* (Yamamoto, 1995, Sorrell, 1996a, García-Hermoso, 1999) en los que se intentaba relacionar cepas clínicas con cepas ambientales o bien diferenciarlas por su origen geográfico.

En nuestro estudio se ha podido detectar por la técnica del RAPD que puede producirse la infección simultánea por dos cepas diferentes de *C. neoformans* en un mismo paciente. Dos de las cepas tenían el *Patrón I* (serotipo A) y una cepa el *Patrón II* (serotipo D). Esto indica que diferentes cepas de *C. neoformans* pueden ser responsables de un solo episodio de criptococosis.

En cambio el patrón electroforético fué similar en las otras dos parejas de aislamientos de cada paciente.