



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Sensibilidad antifúngica *in vitro* de aislados clínicos pertenecientes al
complejo de especies *Cryptococcus neoformans/C. gattii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

NANCY ARELY GARCÍA MEDINA



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

García
Medina
Nancy Arely
55 40 01 42 34
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
311196483

2. Datos del tutor

Dra.
Laura Rosio
Castañón
Olivares

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Francisca
Hernández
Hernández

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Sigfrido
Sierra
Galván

5. Datos del sinodal 3

Biól.
Elva
Bazán
Mora

6. Datos del sinodal 4

QFB
Erika
Córdova
Martínez

7. Datos del trabajo escrito

Sensibilidad antifúngica *in vitro* de aislados
clínicos pertenecientes al complejo de especies
Cryptococcus neoformans/C. gattii
44 p
2020

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo y la motivación para mantenerme fuerte en el camino.

A mi tutora por el apoyo siempre, las enseñanzas y la paciencia.

A la Dra. Franc por la gran motivación de vida.

A Elva y Erika por su apoyo técnico, académico y personal.

A cada una de las personas que estuvieron conmigo durante este largo proceso.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo económico que me brindó gracias al proyecto con clave IN211115.

A mis sinodales por todas las observaciones y recomendaciones para presentar este trabajo.

A la Máxima Casa de Estudios por darme tanto.

“En el esfuerzo radica el mérito”

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Agente etiológico	1
1.1.1 Taxonomía	1
1.1.2 Ecología	2
1.1.3 Características bioquímicas y factores de virulencia	3
1.1.4 Morfología	4
1.1.5 Reproducción	4
1.2 Criptococosis	5
1.2.1 Epidemiología.....	6
1.2.2 Diagnóstico.....	7
1.2.3 Tratamiento	8
1.3 Antifúngicos	8
1.4 Resistencia antifúngica.....	10
1.5 Pruebas de sensibilidad antifúngica.....	11
1.5.1 Métodos comercializados.....	12
1.5.2 Método de difusión en disco	13
1.5.3 Métodos de microdilución	13
ANTECEDENTES	14
OBJETIVOS	16
JUSTIFICACIÓN	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1 Reactivación de aislados.....	18
5.2 Identificación de especies mediante pruebas bioquímicas	18
5.3 Pruebas de sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	18
5.3.1 Preparación del medio RPMI	19
5.3.2 Preparación de antifúngicos.....	19
5.3.3 Preparación del inóculo.....	19
5.3.4 Llenado de placas	20
5.3.5 Lectura de resultados.....	20
5.4 Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	31
PERSPECTIVAS	32
LITERATURA CITADA	33

LISTA DE CUADROS

1. Clasificación por serotipo y genotipo del complejo de especies <i>C. neoformans/C.gattii</i>	2
2. Factores de virulencia del complejo <i>C. neoformans/C.gattii</i>	3
3. Clasificación de los agentes antifúngicos con base en su sitio de acción, tipo de estructura química y mecanismo de acción.....	10
4. Diferencias entre los métodos de referencia del CLSI documento M27-A3 y EUCAST Edef 7.2.....	13
5. Valores de corte epidemiológicos de los antifúngicos para el complejo <i>C. neoformans/C. gattii</i>	14
6. Rango de los valores de CMIs obtenidas en estudios realizados de aislados clínicos de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> en diferentes países.....	15
7. Concentraciones de antifúngicos a ensayar.....	19
8. Sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i> siguiendo los lineamientos del documento M27-A3 del CLSI.....	23

LISTA DE FIGURAS

1. Morfología colonial y microscópica de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	4
2. Reproducción sexual de <i>Cryptococcus</i> spp.....	5
3. Ruta de infección por <i>Cryptococcus</i> spp.....	7
4. Llenado de microplacas.....	20
5. A) Aislados de <i>Cryptococcus</i> spp creciendo en agar Urea; B) <i>C. neoformans/C. gattii</i> en agar Niger; C) <i>C. neoformans s.l.</i> en agar CGB, D) <i>C. gattii s.l.</i> en agar CGB.....	22
6. Actividad antifúngica de AMB en aislados de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	22
7. Distribución de las CMIs ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de anfotericina B (AMB), 5-flucitosina (5-FC), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLZ), posaconazol (PSZ) y ketoconazol (KTZ) de 38 aislados de <i>C. gattii sensu lato</i>	24
8. Distribución de las CMIs ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de anfotericina B (AMB), 5-flucitosina (5-FC), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLZ), posaconazol (PSZ) y ketoconazol (KTZ) de 6 aislados de <i>C. neoformans sensu lato</i>	25
9. Perfil de resistencia antifúngica de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> ante seis diferentes antifúngicos.....	26
10. Patrones de resistencia encontrados en los aislados de <i>C. neoformans sensu lato</i> (A) y <i>C. gattii sensu lato</i> (B). Los números indican cuántos aislados mostraron el patrón indicado.....	26
11. CMIs reportadas en el mundo y su concordancia con los obtenidos en este trabajo.....	27

ABREVIATURAS

µg:	microgramos
µL:	microlitros
µm:	micrómetros
5-FC:	5-flucitosina
ABC:	ATP <i>binding cassette</i>
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADS:	Agar dextrosa Sabouraud
AMB:	Anfotericina B
ARN:	Ácido Ribonucleico
ATCC:	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
BHE:	Barrera hematoencefálica
BHI:	Brain Heart Infusion (infusión cerebro-corazón)
CE:	Control de esterilidad
CGB:	Canavanina-glicina-azul de bromotimol
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio)
CMI (MIC):	Concentración Mínima Inhibitoria (Minimum Inhibitory Concentration)
DMSO:	Dimetil Sulfóxido
CC:	Control de crecimiento
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a Antimicrobianos)
g:	gramos
GXM:	Glucoronoxilomanano
GXMGal:	Glucoronoxilomananogalactano
ITZ:	Itraconazol
IV:	Intravenosa
kg:	kilogramos
KTZ:	Ketoconazol
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
MG:	Media geométrica
mg:	miligramos
mL:	mililitros
MSF:	Major facilitator superfamily (Superfamilia de facilitadores principales)
NCCLS:	National Committee of Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico)
PSZ:	Posaconazol
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
s:	segundos
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC:	Sistema Nervioso Central
TARGA:	Terapia antirretroviral de gran actividad
VCE:	Valores de corte epidemiológicos
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana
WT:	Wild Type (Tipo Salvaje)

INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una micosis causada por levaduras del género *Cryptococcus*. Es una infección aparentemente de baja prevalencia, pero de alta mortalidad (Perfect et al., 2010). La terapia que se establece a los pacientes afectados por criptococosis no siempre da buenos resultados, entre otros motivos, por el hecho de que algunas cepas de *Cryptococcus* spp han desarrollado resistencia secundaria a los tratamientos antifúngicos. Por lo anterior, una medida epidemiológica que debe tomarse en cuenta es la sensibilidad/resistencia que tienen estas levaduras a los antifúngicos usados comúnmente en la práctica clínica. En nuestro país existen pocos estudios sobre el estado de sensibilidad/resistencia de *Cryptococcus* spp ante los diferentes antifúngicos (González et al., 2016).

1.1 Agente etiológico

1.1.1 Taxonomía

Los principales agentes etiológicos de la criptococosis pertenecen al complejo *C. neoformans/C. gattii* cuya clasificación taxonómica es la siguiente (Hagen et al., 2015; Kwon-Chung et al., 2017):

Dominio Eukarya

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Subphylum Agaromycotina

Clase: Tremellomycetes

Orden: Tremellales

Familia: Tremellaceae

Género: *Cryptococcus*

Especies: *C. neoformans* (San Felice) Vuill *sensu lato* y *C. gattii* (Vanbreus y Takashio)
Kwon-Chung *sensu lato*

El estado teleomorfo pertenece al género *Filobasidiella* y las especies son *F. neoformans* Kwon-Chung (estado sexual de *C. neoformans*) y *F. bacillispora* Kwon-Chung (estado sexual de *C. gattii*).

La genotipificación de varias cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* en el mundo, ha revelado que cada especie está compuesta por al menos cuatro subgrupos genéticamente diversos: *C. neoformans* contiene los tipos moleculares VNI, VNII, VNIV; el híbrido intervariedad AD es el tipo molecular VNIII. *C. gattii* comprende los tipos moleculares VGI, VGII, VGIII, VGIV. La composición de polisacáridos de la cápsula permite identificar y clasificar estas levaduras por su serotipo (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Clasificación por serotipo y genotipo del complejo de especies (Hagen et al., 2015).

Especies	Nombre propuesto	Nombre actual	Tipos moleculares	Serotipo
<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI / VNII / VNB	A
	<i>C. deneoformans</i>	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VNIV	D
	<i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>	Híbrido intervariedad	VNIII	AD
<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	-	VGI	B
	<i>C. deuterogattii</i>	-	VGII	B
	<i>C. bacillisporus</i>	-	VGIII	B
	<i>C. tetragattii</i>	-	VGIV	C
	<i>C. decagattii</i>	-	VGIV / VGIIIc	C

1.1.2 Ecología

Cryptococcus spp son levaduras de vida libre, cosmopolitas, que se han aislado de distintas fuentes. A *C. neoformans* principalmente se le aísla de deyecciones de palomas (*Columbia livia*) y otras aves pequeñas, de madera en descomposición, y recientemente se han reportado más casos de aislamientos de *C. neoformans* de fuentes arbóreas en varias partes del mundo. Por otro lado, *C. gattii* se ha logrado aislar principalmente de árboles de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*), pero también de otras especies arbóreas como *Syncarpia glomulifera* y *Guettarda acreana* (Mitchell et al., 2011).

Se ha descrito también que estos hongos pueden ser levaduras endo o epífitas, cuya asociación biotrófica con plantas lleva consigo, tras su floración, la dispersión de las basidiosporas que son potenciales propágulos infecciosos para el humano y otros animales como gatos, perros, caballos, borregos y cabras, aunque la ocurrencia es esporádica. Algunas especies de hongos filamentosos y levaduriformes, entre los cuales se encuentra *Cryptococcus* spp pueden asociarse también a algunas especies de insectos, debido a que los exoesqueletos pueden albergar varias especies de levaduras, promoviendo su supervivencia y dispersión hacia nuevos sustratos (Pagnocca et al., 2008).

La preferencia de *C. neoformans* por el guano como sustrato se debe a su contenido de productos nitrogenados como la creatinina, a la alta concentración de sales y al pH alcalino, que mantienen viable al hongo por varios meses e incluso años si no están expuestos a rayos solares, ya que éstos destruyen al hongo. Las palomas no se infectan debido a su temperatura corporal de 41-42 °C, que excede los rangos de temperatura en la que *C. neoformans* puede crecer (Kwon-Chung et al., 2014).

Tradicionalmente se entendía que la distribución geográfica de *C. gattii* se limitaba a regiones tropicales y subtropicales en asociación con los árboles de eucalipto, sin embargo, la emergencia de *C. gattii* en la Isla de Vancouver (Columbia Británica, Canadá) en 1999 y su propagación por la región de

la costa norte del Pacífico en EUA., así como la detección posterior en otras regiones del mundo, han demostrado la ubicuidad tanto de *C. gattii* como de *C. neoformans* (Mak et al., 2010).

La gran mayoría de las cepas ambientales obtenidas, independientemente del lugar geográfico, pertenecen al serotipo A, tipo molecular VNI (Meyer et al., 2003; Mitchell et al., 2011); en México, en el estudio realizado por López-Martínez y cols. (2014), también se reportó que este mismo serotipo fue el más frecuente. En la clínica los patrones son muy similares (Calvo et al., 2001).

1.1.3 Características bioquímicas y factores de virulencia

Tanto *C. neoformans* como *C. gattii* producen hidrólisis de la urea, utilizan inositol y creatinina, pero no asimilan el nitrato de potasio ni la lactosa, y tampoco fermentan carbohidratos. *Cryptococcus gattii* tiene la capacidad de asimilar D-prolina, glicina y triptófano como único recurso de nitrógeno, y puede crecer en presencia de L-canavanina, glicina y bromotimol, por lo que para poder diferenciar a *C. neoformans* de *C. gattii* se utiliza principalmente el medio que incluye estos compuestos, medio CGB, cuyo fundamento se basa en la resistencia de *C. gattii* a la L-canavanina degradándola y en el proceso se produce amonio como compuesto final que eleva el pH del medio y provoca un viraje del color natural del medio (amarillo verdoso) a un azul cobalto por la presencia de azul de bromotimol en este medio de cultivo (Pérez et al., 2003).

Estas especies producen enzimas y tienen características fenotípicas que se asocian a su virulencia y juegan un papel muy importante en su patogénesis (van Duin et al., 2002; Coelho et al., 2014; Kwon-Chung et al., 2014; González et al., 2016). La recopilación de estos factores se presenta en el **Cuadro 2.**

Cuadro 2. Factores de virulencia del complejo *C. neoformans/C. gattii*.

Factor de virulencia	Composición	Función
Cápsula de polisacáridos	GXM y GXMGal	Facilita la sobrevivencia de la levadura evitándole ser fagocitada.
Producción de melanina	Eumelanina	Protege ante el estrés oxidativo e incrementa la carga negativa de las células, afectando la interacción con las células del huésped.
Crecimiento a 37 °C	-	Esencial para ser capaz de causar una enfermedad invasiva.
Fenoloxidasas	-	Protección contra fagocitosis. Defensa contra diversas proteínas microbicidas y reducción de sensibilidad antifúngica.
Ureasas	-	Contribuyen al paso de las levaduras a través de la BHE.
Fosfolipasas	-	Protección contra rayos UV. Mejoran la adhesión de las levaduras a las células epiteliales del pulmón.

1.1.4 Morfología

C. neoformans y *C. gattii* son especies crípticas que no pueden diferenciarse morfológicamente por su crecimiento en medios de cultivo convencionales. Macroscópicamente, las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* desarrollan colonias mucoides, lisas, brillantes y de color crema a las 48-72 h a 37°C (**Fig. 1A**) en medios convencionales de diagnóstico micológico como el agar dextrosa Sabouraud (ADS) sin cicloheximida, porque ésta inhibe el crecimiento del hongo. Microscópicamente, las células levaduriformes son de esféricas a ovoides con monogemación, raramente multigemación, y presentan su cápsula de polisacáridos (**Figs. 1B y 1C**).

La presencia de la cápsula se puede visualizar mediante una preparación con tinta china (**Figs. 1B y 1C**), reacciones inmunológicas y la utilización de microscopía electrónica. Dependiendo de la cepa, estas levaduras pueden medir de 3 a 8 μm y con la cápsula incluso alcanzar los 80 μm . Algunas cepas producen cápsulas de mayor tamaño en el tejido que en condiciones *in vitro*, lo cual puede deberse a las altas concentraciones de CO_2 en el tejido, bajos niveles de hierro o nutrientes, la exposición al suero y al pH fisiológico de los humanos.

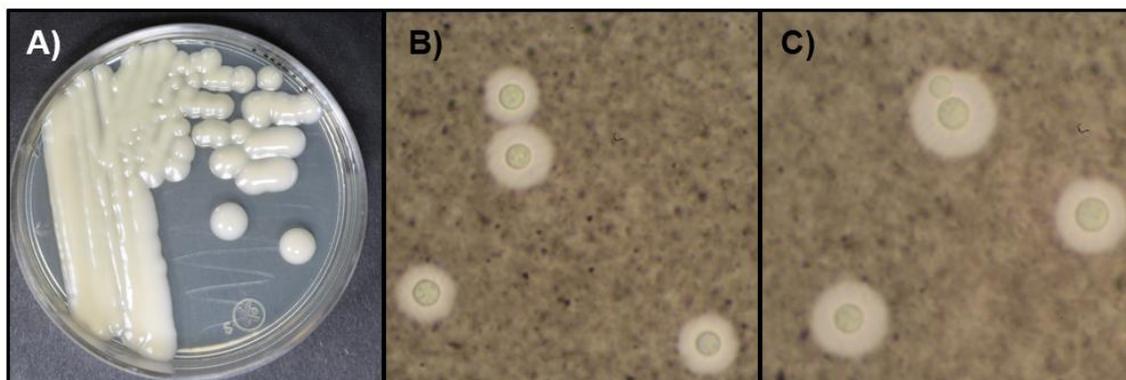


Figura 1. Morfología colonial y microscópica de *Cryptococcus* sp. A) Cultivo en ADS después de 48 h de incubación a 37°C. B) Examen directo con tinta china visto en microscopio óptico a 1000X. C). Gemación de las levaduras en un examen directo con tinta china.

1.1.5 Reproducción

C. neoformans y *C. gattii* existen de manera predominante como formas haploides con reproducción asexual. La región en el genoma donde se encuentra el locus MAT es donde se regula su ciclo sexual. *F. neoformans* y *F. bacillispora* son heterotálicas con los tipos sexuales “a” y “ α ”, aunque esta fase sexual sólo se ha podido observar bajo condiciones controladas de laboratorio. Esta fase teleomorfa se caracteriza por la producción de basidiosporas (Kwon-Chung et al., 2014).

El proceso de apareamiento inicia con el reconocimiento de las feromonas que secretan las células MATa y MAT α . Las células MATa crecen de manera isotrópica y pueden fusionarse con los tubos de conjugación de las células MAT α , el núcleo de esta última se divide y migra hacia el tubo de

conjugación. De forma simultánea, el núcleo MATa se divide y la célula respectiva inicia la formación de la hifa. Los núcleos, a partir de ambos tipos sexuales migran dentro de la hifa, volviéndose dicariótica. Posteriormente un basidio se forma en el ápice de la hifa y subsecuentemente la cariogamia y la meiosis ocurren dentro del basidio. Los cuatro núcleos haploides resultantes repiten mitosis post-meiótica generando cuatro cadenas largas de basidiosporas de manera basípeta; estas basidiosporas pueden iniciar un nuevo ciclo sexual o asexual (**Fig. 2A**). La fructificación monocariótica, o reproducción unisexual, involucra cepas del mismo tipo sexual que producen basidios con basidiosporas viables, similares a las originadas en la reproducción bisexual. Las células pueden diploizarse mediante fusión nuclear o por endoreplicación. En este tipo de reproducción las células de abrazadera o “clamp connections” permanecen sin fusionar. Este fenómeno explica la dominancia ambiental y en la clínica del tipo de apareamiento “ α ” (**Fig. 2B**). Con la dispersión de las esporas, éstas pueden secretar material polisacárido y producir células encapsuladas, o pueden permanecer en estado de latencia como propágulos infecciosos (Kwon-Chung et al., 2014).

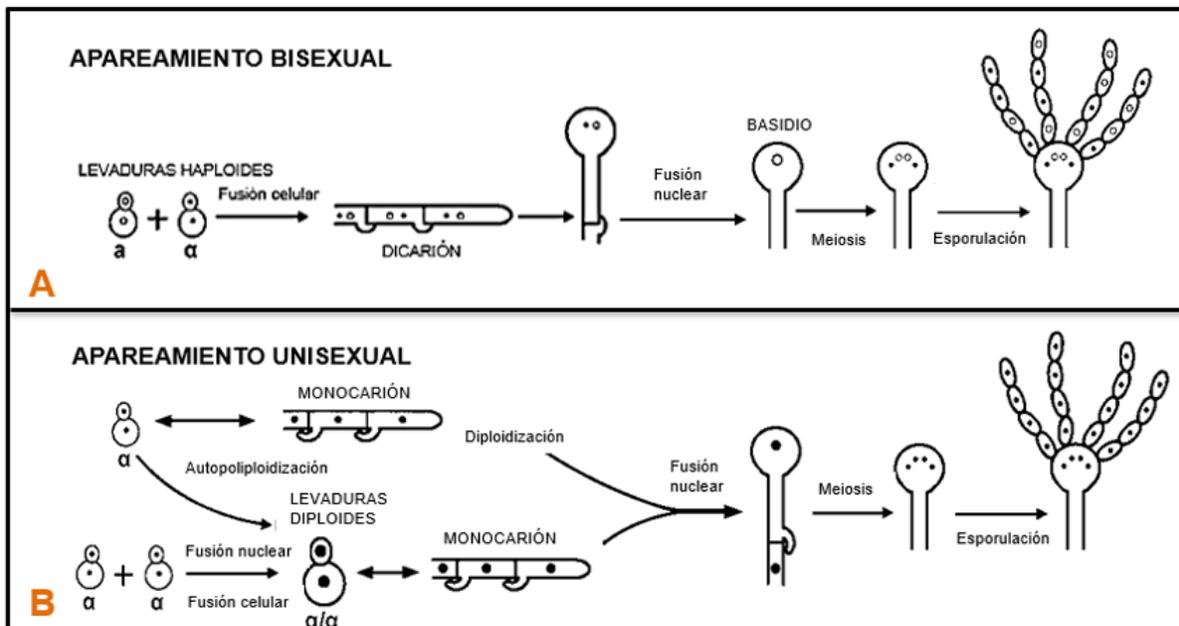


Figura 2. Reproducción sexual de *Cryptococcus* spp. Tomada y modificada de Wang y Lin, 2011.

1.2 Criptococosis

La criptococosis es la micosis sistémica causada principalmente por los miembros pertenecientes al complejo *C. neoformans*/*C. gattii*. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado la prevalencia de criptococosis en gran parte del mundo, así como su directa relación con la inmunodeficiencia mayormente en aquellos casos causados por *C. neoformans*, ya que *C. gattii* afecta principalmente a personas aparentemente inmunocompetentes (Chen et al., 2014).

1.2.1 Epidemiología

Se estima que anualmente se presentan un millón de casos de criptococosis en todo el mundo en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), y se ha visto que está muy relacionado el incremento de la incidencia de esta micosis con el aumento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), por lo que en países con acceso a la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), los casos de criptococosis han disminuido. La criptococosis también se presenta en aquellos pacientes que fueron sometidos a trasplantes de órganos, que están en uso de glucocorticoides, que presentan diabetes mellitus, cirrosis hepática, falla renal crónica, enfermedad de Hodgkin, leucemia, o por alguna neoplasia maligna; sin embargo, también hay casos de infecciones, causadas por *C. gattii*, en pacientes aparentemente inmunocompetentes sin alguna enfermedad de base (Perfect y Bicanic, 2015).

Se ha visto también una alta mortalidad, aproximadamente el 20%, en casos de criptococosis en pacientes en condiciones de inmunosupresión. La criptococosis es la tercera enfermedad que afecta a pacientes VIH positivos, la primera micosis causante de meningoencefalitis con una prevalencia del 10% (Firacative et al., 2018), y la micosis sistémica más frecuente en aquellos pacientes inmunocomprometidos. En México, el panorama no es tan diferente; en un estudio realizado por Méndez-Tovar y cols. (2016) en un hospital mexicano de alta especialidad, se estudió la frecuencia de casos de micosis sistémicas que diagnosticaron entre 1993 y 2013, y los casos de criptococosis constituyeron el 12.7% del total de micosis invasivas, ocupando el tercer lugar, después de la candidosis (55.2%) y la mucormicosis (17.3%). En América Latina, los países con mayor incidencia de criptococosis son Brasil, Colombia, Argentina y México, en orden descendente (Firacative et al., 2018).

Calvo y cols. (2001) realizaron un estudio, donde de 100 aislados clínicos de *Cryptococcus* spp en Brasil, Venezuela y Chile, 60 provenían de pacientes VIH positivos. En el mismo estudio, 89 aislados fueron identificados como *C. neoformans* (serotipo A) y 11 como *C. gattii* (serotipo B), demostrando la prevalencia de *C. neoformans* frente a *C. gattii*.

Esta infección se adquiere por vía respiratoria, mediante la inhalación de propágulos infecciosos con un tamaño menor a 4 μm de diámetro que se alojan en los alvéolos donde entran en contacto con los macrófagos alveolares que reclutan otras células inflamatorias mediante quimiocinas, desencadenándose una respuesta Th1 y una inflamación granulomatosa adecuada. *C. neoformans*/*C. gattii* pueden sobrevivir dentro de los macrófagos y pasar desapercibidos ante el sistema inmunológico, pasando al torrente sanguíneo y así diseminar a otros órganos (Velagapudi et al., 2009).

La infección puede seguir diferentes caminos: En un huésped inmunocomprometido, el hongo sigue su proliferación y diseminación (**Fig. 3**), lo que provoca la enfermedad; en pacientes inmunocompetentes, existe una respuesta inmunitaria eficaz que elimina por completo a la levadura del huésped, o, en otro

escenario, puede ser que las levaduras produzcan un nódulo pulmonar y adenopatía y se mantengan latentes en los tejidos sin destruirse, y de esta manera el huésped permanece asintomático hasta que se presenta algún factor de predisposición que desencadene la replicación de la levadura en ganglios linfáticos pulmonares y logre diseminarse a otros órganos (Marín, 2017).

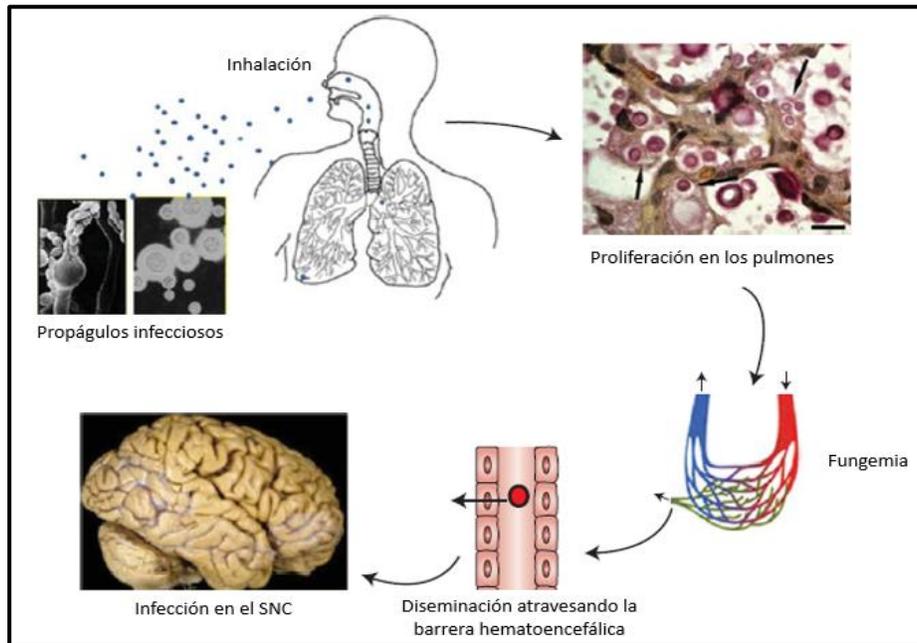


Figura 3. Ruta de infección por *Cryptococcus* spp. Tomada y modificada de Kwon-Chung et al., 2014.

Las manifestaciones clínicas tardan aproximadamente entre una y dos semanas en aparecer después de la exposición al agente etiológico, y éstas al igual que la patogenia están determinadas por el estado inmunitario del paciente, la virulencia de la cepa y el tamaño del inóculo. Los signos y síntomas generales son cefalea, fiebre, vómito en proyectil; los signos y síntomas neurológicos que presentan los pacientes son confusión, signos meníngeos, convulsiones, signos de focalización, diplopía, nistagmus, disdiaconocinesia y arreflexia; y los signos y síntomas respiratorios son la tos, disnea y la hemoptisis (Rivera, 2012).

1.2.2 Diagnóstico

Como se mencionó anteriormente, los signos que se presentan en los pacientes infectados no son específicos ni propios de una criptococosis y no es posible diagnosticar la enfermedad sólo con base en los signos y síntomas, por lo cual es necesario recurrir a técnicas de microbiología para el correcto diagnóstico. La identificación puede realizarse con distintas muestras clínicas como líquido cefalorraquídeo (LCR), suero, secreciones del tracto respiratorio, piel y orina; dependiendo del sitio anatómico afectado. El examen directo con tinta china, que pone de manifiesto la cápsula de los criptococos, es la manera más sencilla. Además del cultivo de fluidos o tejidos en ADS con

cloranfenicol y sin cicloheximida, el agar Urea o agar Niger, así como pruebas inmunológicas como la determinación del antígeno criptocócico por aglutinación de partículas de látex en LCR o suero y exámenes histopatológicos, son grandes herramientas para la identificación de las levaduras criptocócicas (Perfect y Bicanic, 2015).

1.2.3 Tratamiento

El tratamiento contra la criptococosis se suministra en tres etapas: inducción, consolidación y mantenimiento, y depende de la forma clínica y del estado inmunitario del paciente; sin embargo, de manera general, los antifúngicos que se administran son polienos, azoles y pirimidinas fluoradas (Whitney y Bicanic, 2015), cuyos mecanismos de acción se resumen en la producción de daños en la síntesis de ADN y ARN de la célula fúngica, la inhibición de la síntesis de ergosterol y en aumentar la permeabilidad de la membrana fúngica (Catalán y Montejo, 2006).

En formas leves sin compromiso del SNC, usualmente se utiliza fluconazol vía oral 400 mg diariamente por 6 a 12 semanas. El Itraconazol puede ser utilizado también, pero es menos efectivo (Kaplan et al., 2009). Cuando la severidad es mayor y ya hay compromiso del SNC y el paciente es portador del VIH, se indica una primera fase de inducción con anfotericina B vía endovenosa a dosis de 0.7 mg/kg diarios combinado con 5-flucitosina vía endovenosa a dosis de 100 mg/kg, divididas en cuatro dosis durante dos semanas seguido de una fase de mantenimiento con fluconazol a 400-800 mg diarios vía oral por un mínimo de 8 semanas (Perfect et al., 2010; Tello et al., 2013). Cuando la 5-flucitosina no está disponible, como en la gran mayoría de los países de América Latina, se usan otras alternativas como la anfotericina B y el fluconazol (Castañeda y Lizarazo, 2012).

1.3 Antifúngicos

A continuación, se describen las características de algunos antifúngicos usados en el tratamiento contra las infecciones por *Cryptococcus* sp.:

Anfotericina B (AMB). Se comercializa desde 1961 y desde entonces ha sido utilizada para tratar distintas micosis invasivas por su efecto fungicida; sin embargo, su alta hepatotoxicidad ha impulsado a buscar alternativas terapéuticas. La anfotericina B es un polieno de origen natural, producido por la bacteria *Streptomyces nodosus*, y su sitio de acción es la membrana celular. Este antifúngico de alto espectro se une a los esteroides de las membranas eucariontes; en particular es muy afín al ergosterol de la membrana fúngica, aunque a determinadas concentraciones se puede unir a los esteroides de células eucariontes de animales, como el colesterol. Después de su unión, aumenta la permeabilidad de la membrana, permitiendo la pérdida de proteínas, glúcidos y iones, causando así la muerte de la célula fúngica, aunque en algunas células humanas la anfotericina B se puede unir a los esteroides que se encuentran en la membrana celular ocasionando un daño a nivel de la respiración celular, además de activar algunas funciones de los linfocitos que tienen efectos inmunomoduladores (Catalán y

Montejo, 2006). La vía de administración más utilizada, debido a su eficacia de absorción, es la intravenosa.

5-flucitosina (5-FC). En 1957 este fármaco fue descubierto y comercializado. Actualmente se utiliza para tratar infecciones causadas por los géneros *Candida* y *Cryptococcus*, pero ya se han reportado resistencias secundarias a esta droga. Este antifúngico pertenece a la clase de las pirimidinas, y es un derivado fluorado de la citosina. Este fármaco penetra al interior de la célula fúngica al estar en contacto con la citosina permeasa, una enzima de membrana. Una vez estando en el interior de la célula la flucitosina se desamina a su metabolito activo, el 5-fluorouracilo que reemplaza al uracilo durante la síntesis de ARN fúngico, lo que inhibe la síntesis de proteínas fúngicas. Además, el fluorouracilo se metaboliza más a monofosfato de ácido 5-fluorodesoxiuridílico, que inhibe la timidilato sintetasa, interrumpiendo así el metabolismo de los nucleótidos, la síntesis de ADN y también la síntesis de proteínas después de que el ácido fluorardílico se incorpora a la cadena de ARN (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009; National Center for Biotechnology Information, 2018). Su vía de administración es oral, y en pacientes graves se recurre a la infusión intravenosa.

Azoles. Los azoles presentan actividad fungistática por inhibición de las enzimas oxidativas asociadas al citocromo P450, específicamente la 14- α -desmetilasa, una enzima crucial en la producción de ergosterol y otros esteroides, por lo que bloquea la síntesis de ergosterol, provocando la acumulación de precursores, que resulta en un efecto tóxico para la célula fúngica. Los triazoles de 1a y 2a generación son más sensibles a las células fúngicas y menos tóxicos para las células humanas (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009).

Ketoconazol (KTZ). A finales de los años 80s del siglo pasado, los primeros azoles, entre ellos el ketoconazol, se aprobaron para su comercialización. Éste es un agente antifúngico de tipo imidazol que tiene un espectro muy amplio de actividad contra muchas especies de hongos. Se utiliza para el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales y sistémicas. El ketoconazol es una causa bien documentada de daño hepático inducido por fármacos y ya no se recomienda como agente antimicótico de primera línea (National Center for Biotechnology Information, 2018). Se administra por vía oral y cutánea.

Itraconazol y fluconazol (ITZ y FLZ). En 1990 se inició el uso de los triazoles fluconazol y posteriormente itraconazol. Ambos tienen la capacidad de unirse al grupo hemo que también está presente en las enzimas que participan en la síntesis del ergosterol de la membrana fúngica, bloqueando su síntesis e inhibiendo el crecimiento de la célula fúngica (Ruiz-Camps y Cuenca-Estrella, 2009). El itraconazol es una molécula lipofílica e insoluble en agua, que posee un bajo perfil de toxicidad. Fluconazol, a diferencia de otros derivados azólicos como el itraconazol o el ketoconazol, se distribuye fácilmente en el LCR después de la administración oral o IV.

Posaconazol (PSZ). A partir del año 2006 se introdujo este compuesto triazólico de segunda generación. Es un fármaco de amplio espectro con actividad antifúngica. Al igual que los demás azoles inhibe la 14- α -desmetilasa, evitando así la conversión de lanosterol en ergosterol, lo que provoca un cambio en la composición, integridad y permeabilidad de la membrana de la célula fúngica, causando eventualmente lisis celular (National Center for Biotechnology Information, 2018). Su vía de administración también es por vía oral.

Cuadro 3. Clasificación de los agentes antifúngicos con base en su sitio de acción, tipo de estructura química y mecanismo de acción.

Sitio de acción	Estructura química	Mecanismo	Antifúngicos
Membrana celular	Polienos	Aumento en la permeabilidad de la membrana fúngica	Anfotericina B
	Azoles	Inhibición de la síntesis de ergosterol	Imidazol: Ketoconazol Triazoles de 1° generación: Fluconazol, itraconazol Triazoles de 2° generación: Posaconazol
Núcleo	Pirimidinas fluoradas	Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos	5-flucitosina

1.4 Resistencia antifúngica

El incremento en el uso de antifúngicos ha inducido una alta presión de selección en cepas fúngicas y ha causado que algunas especies desarrollen resistencia secundaria, haciendo que los microorganismos más sensibles estén siendo reemplazados por aquellos resistentes, cambiando así la epidemiología de las micosis (Alastruey et al., 2015). Aunque la resistencia antifúngica en especies del género *Cryptococcus* es relativamente rara, el riesgo de desarrollar resistencia secundaria en pacientes con recaídas es un importante problema; sin embargo, también se han descrito casos de resistencia a fluconazol en pacientes que nunca habían estado expuestos a dicho antifúngico (Cheong y McCormack, 2013; Bongomin et al., 2018).

La resistencia a fármacos es un factor que depende de la interacción de factores como el estado del paciente (enfermedad base, estado inmunológico), el antifúngico (dosis, farmacocinética, farmacodinamia), y el agente etiológico (factores de virulencia). Los mecanismos de resistencia antifúngica pueden ser primarios y secundarios, y dependen de las características intrínsecas o adquiridas de los hongos (Ferreira et al., 2015).

La resistencia a anfotericina B es poco común y puede ser primaria, debiéndose principalmente a alteraciones en el ergosterol que forma la membrana fúngica. El contenido de ergosterol es menor en aquellas cepas resistentes. Puede ser resistencia secundaria cuando los pacientes ya habían

recibido polienos no reabsorbibles como profilaxis antifúngica. Cuando se presenta, hay disminución en los niveles de ergosterol en la membrana fúngica, y aumenta la cantidad de fosfolípidos que impiden el paso del fármaco a los esteroides (Torales, 2014).

El problema con la 5-flucitosina ha sido la emergencia de resistencia durante la terapia. Esta resistencia es causada por una disminución de la actividad de la enzima citosina-permeasa o desaminasa y/o por una disminución de la actividad de la enzima uracil fosforribosil-transferasa, enzima responsable de la conversión del 5-fluoracil en ácido 5-fluororidílico (Vu et al., 2018).

En estudios sobre los mecanismos de resistencia antimicrobiana se ha apreciado un incremento de caracteres fenotípicos expresados en pequeñas subpoblaciones dentro de una población que les permiten sobrevivir y crecer en presencia de elevadas concentraciones de medicamento. A este fenómeno se le llama "heterorresistencia"; es un mecanismo adaptativo para contrarrestar el estrés ante el aumento de las concentraciones de fármacos y puede mejorar la capacidad de un microorganismo para sobrevivir bajo presión antifúngica (Ferreira et al., 2015).

Los azoles presentan varios mecanismos de resistencia, siendo la resistencia secundaria la más común; ésta es ocasionada por el aumento en la expresión de las bombas de flujo o transportadores, específicamente las ABC (ATP binding cassette) en general para los azoles, o los MSF (major facilitators superfamily) específicamente para fluconazol, que resulta en un incremento de la expulsión del fármaco. También pueden ser resistentes como resultado de las mutaciones que pudiera presentar el gen que codifica para la enzima 14- α -desmetilasa, debido a la disminución de la afinidad de los azoles por dicha enzima. Análisis realizados en cepas obtenidas de pacientes cuya terapia fue fallida, reveló que una concentración diez veces mayor de fluconazol fue requerida para inhibir la 14- α -desmetilasa en comparación con las cepas sensibles (Lamb et al., 1995).

1.5 Pruebas de sensibilidad antifúngica

Las pruebas de sensibilidad antifúngica se han convertido en herramientas esenciales que permiten guiar el tratamiento de las infecciones fúngicas y también conocer sus aspectos epidemiológicos locales y globales, así como identificar resistencias y comprender la base molecular de los mecanismos implicados.

Anteriormente, estas pruebas se realizaban por diversos métodos que se basaban principalmente en la dilución en caldo y la difusión en agar, pero los métodos eran poco reproducibles debido a la ausencia de algún documento estandarizado. En 1985 el entonces National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS), ahora el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), realizó un estudio en colaboración con diferentes laboratorios para saber cuáles eran los métodos que usaban para sus

pruebas de sensibilidad antifúngica y se les solicitó que reportaran sus Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) que obtenían mediante ellos; obtuvieron resultados muy variables: mientras que algunos laboratorios reportaban un aislado resistente, otros reportaban el mismo aislado como sensible, por lo que se determinó la necesidad de desarrollar un método estándar para las pruebas de sensibilidad antifúngica, de tal manera que fuera reproducible entre laboratorios alrededor del mundo (Fothergill et al., 2006; Cantón et al., 2007; Zapata-González y Cardona-Castro, 2012).

Se han desarrollado estándares estadounidenses y europeos, así como métodos comerciales equivalentes que son más apropiados para laboratorios clínicos. Se han llevado a cabo varios estudios que correlacionan los resultados *in vitro* con los efectos en los pacientes, llegando a la conclusión de que las infecciones causadas por los aislados fúngicos resistentes tienen un resultado peor que aquellos sensibles; y recopilaciones de datos como estos han permitido el establecimiento de puntos de corte interpretativos para *Candida* spp y *Aspergillus* spp, quienes son los agentes etiológicos de dos de las micosis más frecuentes en el mundo (Alastruey et al., 2015); sin embargo, se siguen haciendo esfuerzos para determinar los puntos de corte en más especies fúngicas de importancia clínica.

Los reportes de perfiles de sensibilidad se basan en los valores de las CMI, que representan aquellas concentraciones más reducidas del fármaco que causan una inhibición determinada en el crecimiento de los microorganismos con interés clínico. Generalmente se usa el criterio de una inhibición del 50% (MIC₅₀) y 90% (MIC₉₀) del crecimiento que hay en la población muestreada para el reporte de dicho perfil.

1.5.1 Métodos comercializados

Algunos métodos disponibles comercialmente, incluidos los manuales, semiautomatizados y automatizados, no requieren un manejo complejo y son métodos alternativos rentables para probar la sensibilidad de agentes antifúngicos *in vitro* contra aislados de *Candida* spp en uso rutinario, y también aislados de *Cryptococcus* spp y hongos filamentosos con fines de investigación. Algunos de estos métodos se describen enseguida:

Etest®. Es fácil de realizar y determina la sensibilidad de levaduras y hongos filamentosos frente a diferentes antifúngicos. Es una técnica cuantitativa que consiste en la utilización de una tira de plástico con un gradiente de concentración de algún antimicrobiano sobre una placa de agar previamente inoculada con el hongo a estudiar. Se incuba a 37 °C por 24-48 h y en este tiempo se visualizará una elipse de inhibición mediante la cual se determina la CMI (Biomerieux, 2012).

Sensitre® YeastOne® es una prueba de sensibilidad para hongos fáciles de manipular incluyendo a especies de *Candida* y *Cryptococcus*. Cuenta con un sustrato cromogénico que facilita la lectura e

interpretación de la CMI y se basa en el método de microdilución estandarizado del CLSI (MCS Diagnostics, 2012; Torales, 2014).

Vitek® 2 utiliza la lectura espectrofotométrica y es útil para la identificación de especies microbianas y las pruebas de sensibilidad (Melhem et al., 2014).

1.5.2 Método de difusión en disco

La principal ventaja de este método es su bajo costo en comparación con la microdilución y los métodos comercializados. En 2003 el CLSI en su persistente camino de la estandarización de las pruebas de sensibilidad en laboratorios clínicos, publicó el documento M44-A, que se aprobó un año después. Es un método similar al Kirby-Bauer usado para probar la sensibilidad bacteriana, usando el mismo medio, agar Mueller-Hinton, pero suplementado con glucosa y azul de metileno (Cantón, et al., 2007; CLSI, 2018).

1.5.3 Métodos de microdilución

Los métodos de microdilución son el estándar de oro de las técnicas de referencia para probar la sensibilidad microbiana. Actualmente dos organizaciones, el EUCAST (*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*) y el CLSI han estandarizado métodos para llevar a cabo pruebas de sensibilidad antifúngica.

Ambas instituciones incluyen en sus métodos algunas modificaciones para el caso particular de *Cryptococcus* spp y existen algunas diferencias entre cada método (**Cuadro 4**); sin embargo, los resultados que se han reportado han demostrado no tener diferencias significativas (Espinel-Ingroff et al., 2005; Pfaller et al., 2011; Arendrup et al., 2017; Dalyan et al., 2018).

Cuadro 4. Diferencias entre los métodos de referencia del CLSI documento M27-A3 y EUCAST EDef 7.2

	CLSI M27-A3	EUCAST E.Def 7.2
Fondo del pozo de las microplacas	Redondo	Plano
Medio de dilución	RPMI 1640	RPMI 1640
Contenido de glucosa	0.2 %	2 %
Tamaño del inóculo	0.5 – 2.5 x 10 ³	0.5 – 2.5 x 10 ⁵
Temperatura de incubación	35 °C	35 °C
Tiempo de incubación para <i>Cryptococcus</i> spp	72 h	48 h
Lectura	Visual	Espectrofotométrica
Interpretación de la CMI (inhibición)	AMB 100 % Azoles y pirimidinas 50 %	AMB 90 % Azoles y pirimidinas 50 %

ANTECEDENTES

Actualmente no existen puntos de corte establecidos por el CLSI para el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, por lo que los estudios anteriores sólo reportaban la media geométrica (MG) de los valores de CMIs, el rango de dichos valores y en algunos casos la MIC₅₀ y MIC₉₀; y en consecuencia el perfil de sensibilidad no podía reportarse. Algunos autores optaron por usar los puntos de corte establecidos por el CLSI en el documento M27-A2 para algunas especies de *Candida* (Gutch et al., 2015). Sólo por nombrar un caso de la evaluación de sensibilidad ante ciertos antifúngicos, en el estudio retrospectivo realizado por Bongomin y colaboradores (2018), se recabaron los puntos de corte que han sido utilizados en los artículos reportados entre 1988 y 2017 para determinar resistencia a fluconazol y obtuvieron que el 38% de los estudios usó el valor de CMI ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para considerar una cepa como resistente, el 21% usaron CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, 38% usó el valor de CMI ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, y el 3% determinó resistencia con una CMI ≤ 20 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo ocurre lo mismo para con los restantes antifúngicos usados en este estudio.

Cuando el único dato disponible es la distribución de la CMI y no se puede determinar un punto de corte, los valores de corte epidemiológicos (VCE) son una herramienta disponible que puede proporcionar alguna orientación para el tratamiento (Lockhart et al., 2017). Esta variable puede ser un indicador de la emergencia de cambios en los patrones de sensibilidad de los microorganismos frente a los fármacos evaluados. La definición del VCE es la CMI que separa a los aislados que presentan algún mecanismo de resistencia en una población de aquellos que no, y depende del método que se haya usado para generar los valores de CMIs: los VCE basados en los valores de CMIs obtenidos por el método de microdilución no necesariamente coincidirán con aquellos obtenidos mediante otro método como las pruebas Etest® o el sistema Vitek® 2 (Espinel-Ingroff et al., 2012; Sánchez et al., 2017).

En el 2011, Pfaller y cols. determinaron los VCE a partir de un análisis de sensibilidad antifúngica de 1,271 aislados clínicos de *C. neoformans* contra fluconazol y posaconazol, obtenidos en al menos 100 centros médicos.

En 2012, Espinel-Ingroff y cols. establecieron los VCE para el complejo *C. neoformans/C. gattii* contra anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Valores de corte epidemiológicos para el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*.

Antifúngico / VCE	AMB*	5FC*	KTZ+	FLZ*	ITZ*	PSZ*
<i>C. neoformans</i>	1	16	0.125	16	0.5	0.25
<i>C. gattii</i>	0.5	4	0.125	8	0.5	0.5

* Espinel-Ingroff y cols., 2012
+ Gutch y cols., 2015

A pesar de no reportar los aislados como sensibles o resistentes, los estudios previos a la propuesta de los VCE, sí se han reportado las CMI obtenidas en distintas partes del mundo (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Rango de los valores de CMIs obtenidas en estudios realizados con aislados clínicos de *C. neoformans* y *C. gattii* en diferentes países.

Año	Autor	País	Especie	Resultados	
				Antifúngicos	Rango de CMIs (µg/mL)
2018	Hong et al.	China	<i>C. neoformans</i> (22)	AMB	0.25 – 0.5
				FLZ	0.5 – 8
				ITZ	0.03 – 0.25
				5FC	2 – 8
				PSZ	0.008 – 0.125
2018	Theill et al.	Argentina	<i>C. neoformans</i> (88)	AMB	0.03 – 0.5
				FLZ	1 – 16
				5FC	2 – 8
				ITZ	0.03 – 0.25
				PSZ	0.03 – 0.25
2017	Nascimento et al.	Brasil	<i>C. neoformans</i> (61)	AMB	0.13 – 0.5
				FLZ	1 – 16
				ITZ	0.03 – 1
			<i>C. gattii</i> (7)	5FC	4 – 16
				AMB	0.062 – 0.5
				FLZ	2 – 16
				ITZ	0.13 – 0.25
2016	Herkert et al.	Brasil	<i>C. gattii</i> (18)	5FC	4 – 16
				AMB	0.062 – 0.25
				FLZ	0.5 – 16
				ITZ	0.03 – 0.25
				PSZ	0.03 – 0.25
2015	González et al.	México	<i>C. neoformans</i> (153)	AMB	0.125 – 1
				FLZ	0.5 – 4
			<i>C. gattii</i> (13)	AMB	0.125 – 1
				FLZ	0.5 – 4
2015	Morales et al.	Brasil	<i>C. neoformans</i> (17)	AMB	0.25 – 1
			<i>C. gattii</i> (18)	AMB	0.5 – 1
2015	Gutch et al.	India	<i>C. neoformans</i> (58)	FLZ	0.062 – 64
				ITZ	0.03 – 1
				KTZ	0.03 – 0.25
			<i>C. gattii</i> (5)	FLZ	2 – 64
				ITZ	0.03 – 0.5
				KTZ	0.03 – 0.125
2014	Favalessa et al.	Brasil	<i>C. neoformans</i> (17)	AMB	0.5 – 1
				FLZ	1 – 16
				ITZ	0.03 – 0.25
				5FC	0.5 – 8
			<i>C. gattii</i> (10)	AMB	0.5 – 1
				FLZ	1 – 16
				ITZ	0.03 – 5
				5FC	1 – 16
2014	Mahabeer et al.	Sudáfrica	<i>C. neoformans</i> (102)	AMB	≤0.008 – 1
				FLZ	0.25 – 4

OBJETIVOS

General

Conocer el perfil de sensibilidad antifúngica *in vitro* de aislados clínicos mexicanos pertenecientes al complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*.

Particulares

- Identificar patrones de resistencia en los aislados probados.

- Evaluar las diferencias de sensibilidad entre *C. neoformans sensu lato* y *C. gattii sensu lato*.

JUSTIFICACIÓN

Los estudios de sensibilidad a antifúngicos convencionales de aislados clínicos de *C. neoformans sensu lato* y *C. gattii sensu lato* son escasos en México.

Castañón en 2009 y González y cols. en 2016 publicaron sus respectivos hallazgos, pero para una representación real de la situación de la sensibilidad antifúngica, hay que seguir una “historia” que vaya actualizando año con año los datos reales en la práctica médica.

En ninguno de los dos trabajos mencionados anteriormente se probaron antifúngicos de nueva generación como el posaconazol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudió la sensibilidad antifúngica de 44 aislados clínicos de *Cryptococcus neoformans/C. gattii* provenientes de dos hospitales en la Ciudad de México (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias) que se conservaban en criopreservación en la Colección de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología.

Los aislados fueron sometidos a reactivación metabólica sembrándolos en el caldo de cultivo BHI (infusión cerebro-corazón). Después del crecimiento del hongo se verificó la pureza con una tinción de Gram y cultivo en ADS. Posteriormente se resembraron en agar Niger y agar Urea para corroborar su pertenencia al género *Cryptococcus*, y en medio CGB para la diferenciación entre *C. neoformans sensu lato* y *C. gattii sensu lato*. Posteriormente se determinó la sensibilidad antifúngica por el método de microdilución en caldo siguiendo los lineamientos indicados en el documento M27-A3 del CLSI. Los antifúngicos evaluados fueron anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y posaconazol.

5.1 Reactivación de aislados

En primera instancia, los aislados fueron sometidos a reactivación metabólica sembrándolos en el medio de cultivo rico en nutrientes BHI durante un periodo de incubación de alrededor de 72 h a 25 °C para obtener un crecimiento óptimo del hongo. Posteriormente se cultivaron en ADS durante 48 h a 37°C para comprobar su viabilidad; se corroboró su pureza mediante una tinción de Gram y se hizo una resiembra para mantenerlos en viales con ADS y cloranfenicol a 4 °C hasta la ejecución de las pruebas de sensibilidad.

5.2 Identificación de especies mediante pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de las especies *C. neoformans sensu lato* y *C. gattii sensu lato*. Todos los aislados se sembraron en agar Urea para la identificación de especies pertenecientes a género *Cryptococcus*. Posteriormente se sembraron en agar Niger para la diferenciación de las especies pertenecientes al complejo *C. neoformans/C. gattii*. Se sembraron también en medio CGB para diferenciar a *C. gattii*.

5.3 Pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro*

Las pruebas de sensibilidad antifúngica se realizaron siguiendo el método de referencia M27-A3 del CLSI. La sensibilidad de cada aislado del complejo *C. neoformans/C. gattii* se determinó por duplicado y para la confiabilidad de los resultados se utilizaron cepas de referencia que cumplieran con los estándares de crecimiento propuestos por el CLSI. Se usaron las cepas de referencia *Candida parapsilosis* ATCC y *Candida. krusei* ATCC.

5.3.1 Preparación del medio RPMI

Se preparó el medio comercial RPMI 1640 (In vitro S.A.) con 0.2% de glucosa, se ajustó a un pH de 7 ± 0.1 , se esterilizó por filtración al vacío usando un filtro de membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ y se almacenaron en alícuotas de 50 mL para mejor comodidad de uso y disminuir las probabilidades de contaminación. Se comprobó la esterilidad del medio de cultivo y posteriormente se mantuvo a $4\ ^\circ\text{C}$ en condiciones de oscuridad hasta su uso respetando su caducidad.

5.3.2 Preparación de antifúngicos

Como lo indica el documento M27-A3, CLSI, para preparar la solución madre de los antifúngicos solubles en agua (FLZ y 5-FC), se pesó la cantidad de la sal del antifúngico para obtener una concentración al menos diez veces mayor a la concentración a ensayar y se diluyó en agua estéril. Para los antifúngicos insolubles en agua (AMB, ITZ, KTZ y PSZ) se preparó la solución madre a una concentración cien veces mayor a la concentración a ensayar y se usó dimetil sulfóxido (DMSO) como diluyente.

Posteriormente para obtener las soluciones de trabajo se diluyeron las soluciones madre de los antifúngicos solubles en agua con medio RPMI 1640 y de aquellos insolubles en agua con DMSO de tal manera que se obtuvieron las concentraciones señaladas en el **Cuadro 7**.

Cuadro 7. Concentraciones de antifúngicos a ensayar.

Antifúngico	Propiedad	Concentración Sol. madre ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Sol. trabajo ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración a ensayar ($\mu\text{g/mL}$)
FLZ	Solubles en agua	1280	128	64 – 0.12
5FC		1280	128	64 – 0.12
AMB	Insolubles en agua	1600	32	16 – 0.03
ITZ		1600	32	16 – 0.03
KTZ		1600	32	16 – 0.03
PSZ		1600	32	16 – 0.03

Finalmente se prepararon alícuotas de 1 mL de las soluciones de trabajo para mayor practicidad del ensayo y pensando en una disminución de posibles contaminaciones. Se almacenaron en condiciones de congelación a $-20\ ^\circ\text{C}$ hasta su uso.

5.3.3 Preparación del inóculo

Se incluyeron como control de calidad cepas ATCC de *C. parapsilosis* y *C. krusei*. A partir de un cultivo de 24 h (cepas de referencia) y 48 h (cepas experimentales) en ADS a $35\ ^\circ\text{C}$, se hizo una suspensión al 0.5 en la escala de McFarland en 5 mL de solución salina fisiológica (8.5 g/L NaCl) obteniéndose así una suspensión de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Esta solución se homogenizó con Vortex durante 15 s, Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 seguida de otra dilución 1:20 en medio RPMI 1640, lo que al final resultó en una concentración de trabajo de 5.0×10^2 a 2.5×10^3 células/mL.

5.3.4 Llenado de placas

Se colocaron 100 μL de medio RPMI a todos los pozos de la microplaca con una micropipeta multicanal de 12. Posteriormente se agregaron 100 μL de la solución de trabajo del antifúngico a probar en todos los pozos de la columna 2, a partir de la cual se realizaron las diluciones dobles seriadas hasta la columna 11. La columna 1 fue el control de esterilidad (CE) y la columna 12 fue el control de crecimiento (CC). Por último, se agregaron 100 μL del inóculo preparado en todas las columnas, exceptuando la columna 1 del CE; así, las concentraciones de los pozos se diluyeron 1:2, por lo que la concentración a ensayar de los antifúngicos hidrosolubles fue de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en aquellos insolubles en agua. Terminado el proceso, las placas se incubaron durante 72 h a 35 $^{\circ}\text{C}$, haciendo las lecturas intermedias a las 24 y 48 h (**Fig. 4**).

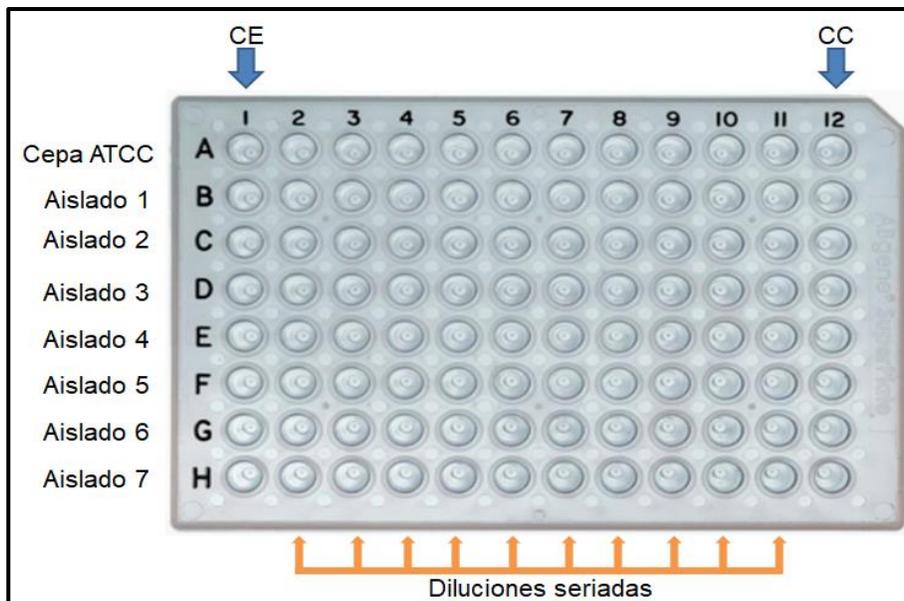


Figura 4. Llenado de placas

5.3.5 Lectura de resultados

Se realizó la lectura visual de la prueba a las 24 y 48 h, aunque la lectura a las 72 h fue la determinante de las CMI. Los VCE para cada antifúngico evaluado en este estudio se muestran en el **Cuadro 5**. Valores de CMI menores o iguales a los VCE fueron considerados como sensibles.

La cantidad de crecimiento en los pocillos que contenían inóculo sometido a ciertas concentraciones de antifúngico se comparó con el CC y se le adjudicó un lugar de la escala numérica: 0: ópticamente claro, 1: ligeramente turbio, 2: disminución prominente de la turbidez, 3: ligera disminución de la turbidez o 4: sin disminución de la turbidez.

Para determinar la CMI de AMB, se consideró aquella concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento fúngico en un 100%, es decir, la columna que tuviera una puntuación de 0 (ópticamente

claro); y en un 50% para los antifúngicos restantes (5-flucitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y posaconazol), es decir, la CMI fue aquella concentración más baja que presentó una puntuación de 2 (disminución prominente de la turbidez).

La interpretación de los resultados con base en la resistencia y sensibilidad se hizo con base en los VCE establecidos por Espinel-Ingroff y colaboradores (2012) para AMB, 5-FC, FLZ, ITZ y PSZ. No hay datos interpretativos para KTZ para el complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, por lo que la interpretación se realizó usando los puntos de corte para *Candida albicans* recomendados por Gutch y cols. (2015) (**Cuadro 5**).

5.4 Análisis estadístico

El programa Excell® 2016 se usó para determinar los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀, así como la media geométrica. Los valores de CMIs de *C. gattii* y *C. neoformans* se compararon por la prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección, con un nivel de significancia del 0.5, en el programa IBM SPSS Statistics 22 debido a la ausencia de normalidad de los datos.

RESULTADOS

Todos los aislados dieron positivo para la prueba de hidrólisis de la urea (**Fig. 5A**). Todos los aislados produjeron pigmento en agar Niger (**Fig. 5B**). De los 44 aislados clínicos que se sembraron en medio CGB, 38 (86%) fueron identificados como *C. neoformans sensu lato* por su inhibición en el medio (**Fig. 5C**) y 6 (14%) como *C. gattii sensu lato* por su crecimiento en ese medio (**Fig. 5D**).

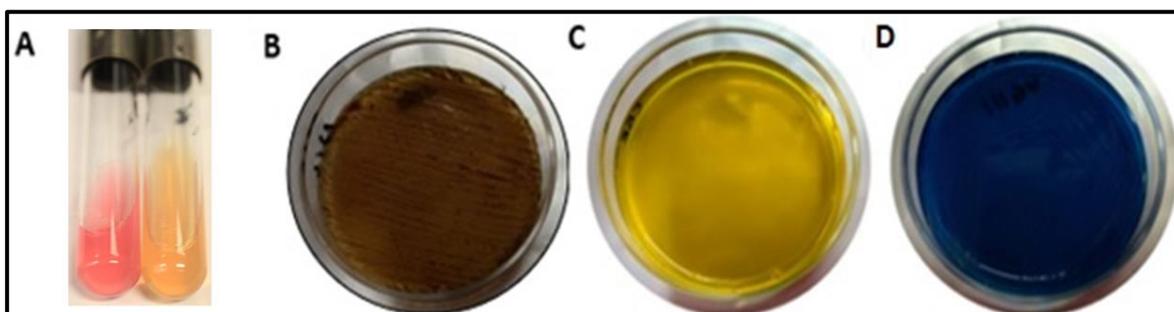


Figura 5. A) *Cryptococcus* spp con desarrollo en agar Urea (lado derecho control negativo); B) *C. neoformans/C. gattii* en agar Niger; C) *C. neoformans s.l.* en agar CGB, D) *C. gattii s.l.* en agar CGB.

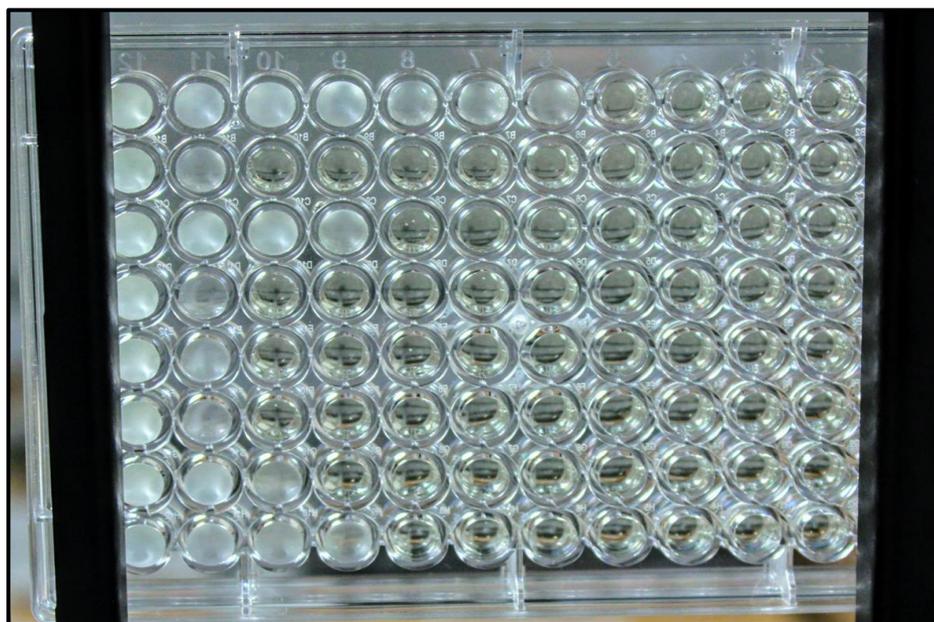


Figura 6. Actividad antifúngica de AMB en aislados de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. Fotografía tomada desde la cara inferior de la microplaca; muestra la inhibición del crecimiento conforme incrementa la concentración de antifúngico.

Los rangos de MG, al igual que los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ de los 38 aislados de *C. neoformans* y 6 de *C. gattii*, se muestran en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Sensibilidad antifúngica *in vitro* siguiendo los lineamientos del documento M27-A3 del CLSI.

Especie	Antifúngico	Rango (µg/mL)	MG (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)
<i>C. neoformans sensu lato</i>	AMB	0.062 – 1	0.030	0.125 – 0.312	0.062 – 1
	5FC	0.25 – 64	4.684	1 – 4	0.5 – 8
	KTZ	0.03 – 0.5	0.118	0.03 – 0.25	0.03 – 0.25
	FLZ	1 – 32	7.052	2 – 8	2 – 16
	ITZ	0.5 – 16	9.381	2 – 16	0.95 – 16
	PSZ	0.03 – 1	0.335	0.125 – 0.5	0.062 – 1
<i>C. gattii sensu lato</i>	AMB	0.062 – 1	0.291	0.062 – 0.437	0.062 – 0.7
	5FC	0.5 – 8	3.416	1.625 – 5	0.5 – 6.4
	KTZ	0.03 – 0.125	0.056	0.03 – 0.077	0.03 – 0.099
	FLZ	1 – 16	7.666	3.5 – 10	2 – 12.8
	ITZ	0.25 – 8	3.541	0.812 – 8	0.25 – 8
	PSZ	0.03 – 0.25	0.109	0.054 – 0.156	0.03 – 0.20

Rango: Rango de las CMIs

MG: Media geométrica.

MIC₅₀: CMI (µg/mL) en donde 50% de la población de los aislados fue inhibida.

MIC₉₀: CMI (µg/mL) en la cual el 90% de la población de los aislados fue inhibida.

Para *C. neoformans*, el agente antifúngico con la MG más alta fue ITZ, seguido de FLZ y 5-FC (**Figs. 7 y 8**). Para los aislados de *C. gattii* el panorama fue similar, con FLZ presentando los valores de CMIs (MG) más altos, seguido de ITZ y 5-FC (**Figs. 6 y 8**).

Los perfiles de resistencia son mostrados en la **Figura 9**. La actividad antifúngica de los fármacos con *C. neoformans* y *C. gattii* no mostró diferencias significativas, sólo hubo diferencia estadísticamente significativa cuando los aislados fueron sometidos a posaconazol (nivel de significancia = 0.5).

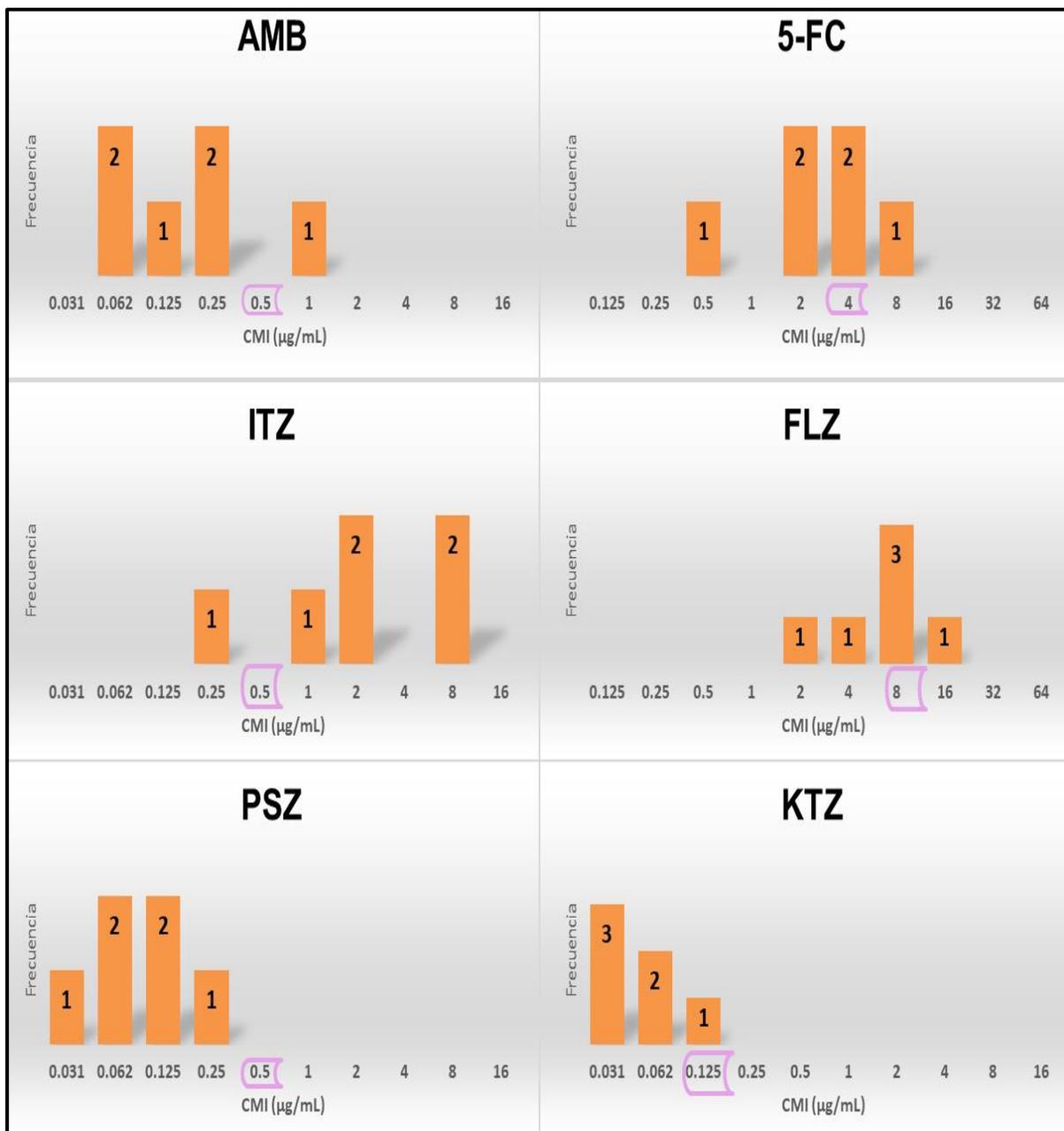


Figura 7. Distribución de las CMIs (µg/mL) de anfotericina B (AMB), 5-flucitosina (5-FC), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLZ), posaconazol (PSZ) y ketoconazol (KTZ) de 38 aislados de *C. gattii sensu lato*. VCE señalados con “”.

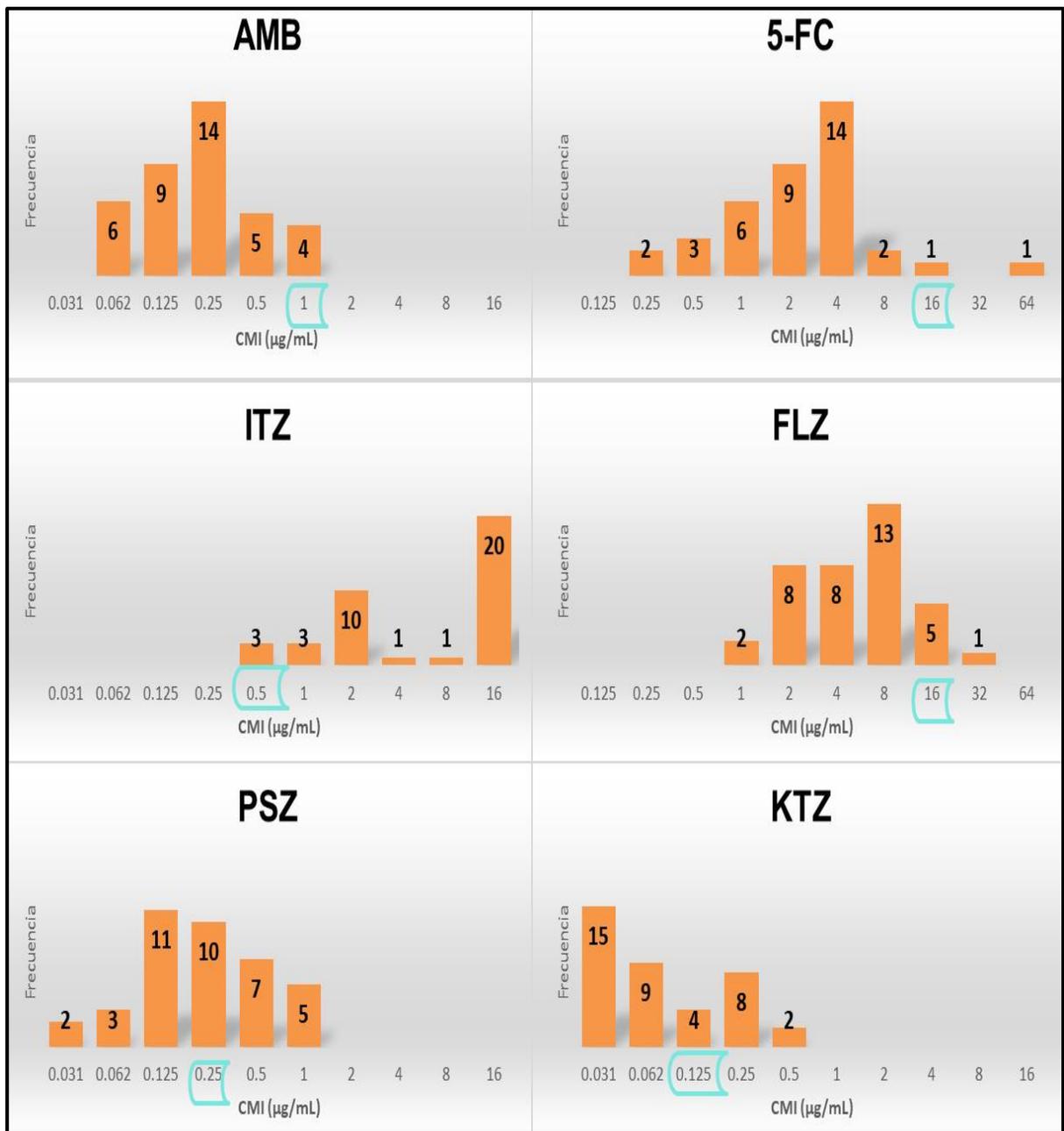


Figura 8. Distribución de las CMI (µg/mL) de anfotericina B (AMB), 5-flucitosina (5-FC), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLZ), posaconazol (PSZ) y ketoconazol (KTZ) de 6 aislados de *C. neoformans sensu lato*. VCE señalados con “”.

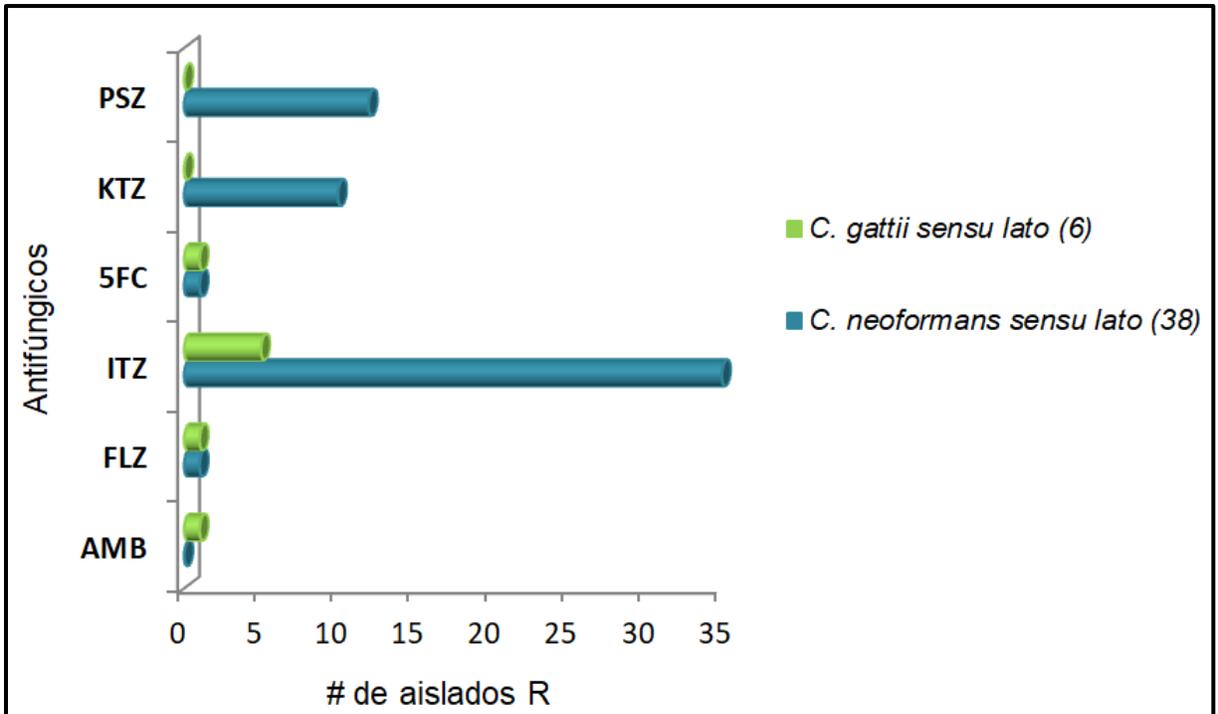


Figura 9. Perfil de resistencia antifúngica de *C. neoformans* y *C. gattii* ante seis diferentes antifúngicos. PSZ: posaconazol; KTZ: ketoconazol; 5FC: 5-flucitosina; ITZ: itraconazol; FLZ: fluconazol; AMB: anfotericina B.

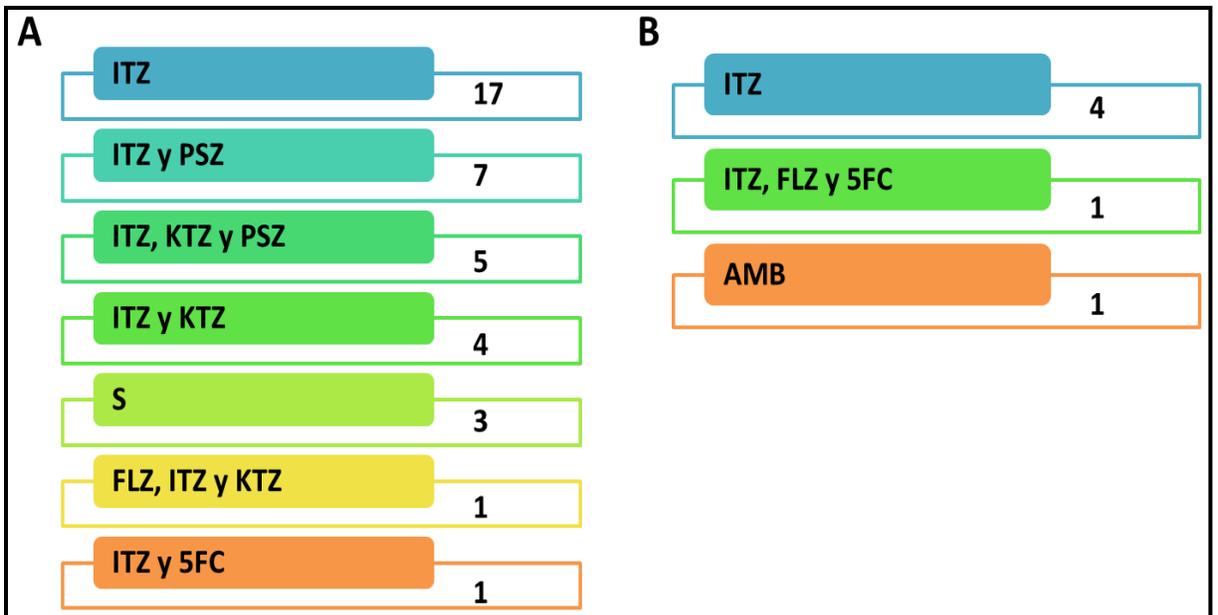


Figura 10. Patrones de resistencia encontrados en los aislados de *C. neoformans sensu lato* (A) y *C. gattii sensu lato* (B). Los números indican cuántos aislados mostraron el patrón indicado. PSZ: posaconazol; KTZ: ketoconazol; 5FC: 5-flucitosina; ITZ: itraconazol; FLZ: fluconazol; AMB: anfotericina B; S: sensible.

DISCUSIÓN

La proporción de aislados de *C. neoformans* s.l. y *C. gattii* s.l. obtenida en este estudio concuerda con los datos reportados en diferentes países, donde se reporta que el agente etiológico de la criptococosis más frecuente es *C. neoformans*. En este estudio el 86% de los aislados fueron *C. neoformans* y el 14% restante *C. gattii*.

La distribución de los valores de las CMI de los seis antifúngicos evaluados en los aislados de *C. neoformans* y *C. gattii* fue similar a los patrones reportados en otras regiones del mundo (**Cuadro 6**; **Fig. 11**) con algunas excepciones que enseguida se desarrollan.

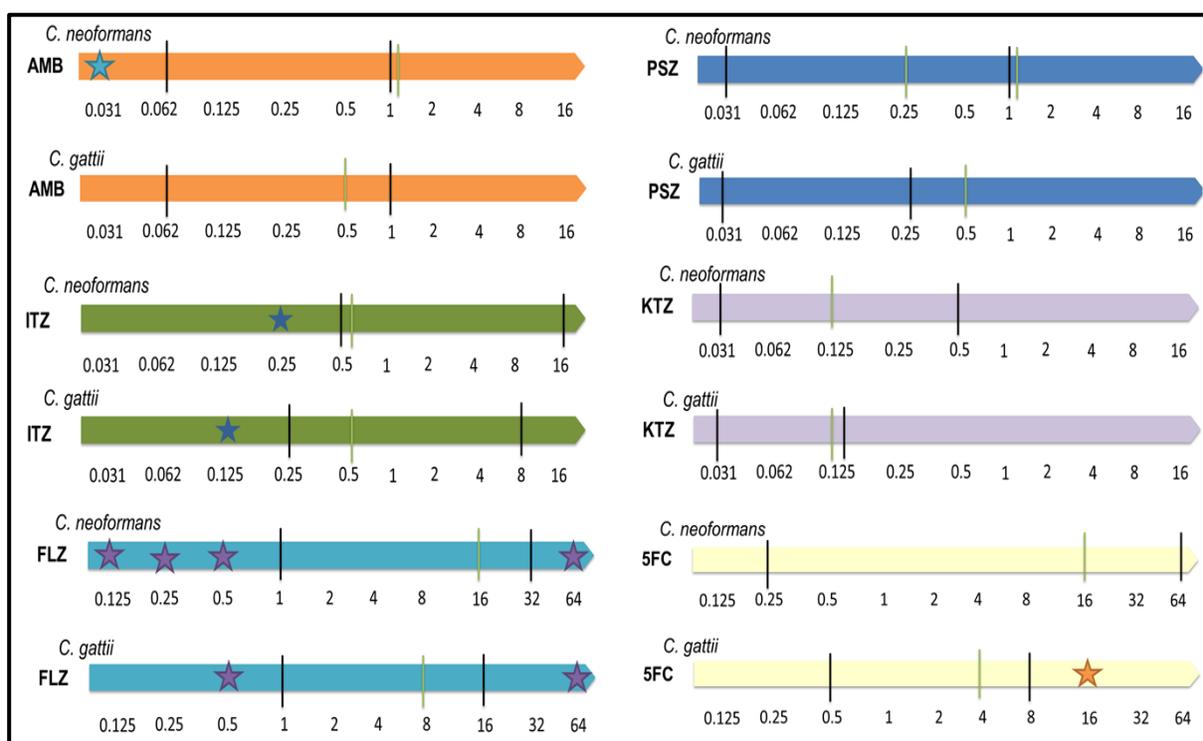


Figura 11. CMI reportadas en el mundo y su concordancia con los obtenidos en este trabajo. Las líneas negras verticales representan los valores menores y mayores de CMI para cada antifúngico con aislados de *C. neoformans* y *C. gattii* que se obtuvieron en este estudio (**Cuadro 8**). Se encuentran señalados con un "★" los datos fuera del rango de CMI que se han reportado en otras partes del mundo. Las líneas verdes verticales señalan el VCE.

Anfotericina B

Varios estudios realizados alrededor del mundo han demostrado la buena actividad antifúngica que tiene la AMB frente a las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii*. La MG de la CMI de AMB en este estudio, concuerda con los resultados que González y colaboradores reportaron en 2016 en el Noreste de México (González et al., 2016). En el presente estudio un aislado de *C. gattii* resultó resistente a AMB, y aunque el mecanismo del desarrollo de la resistencia a AMB no está claro, puede

estar relacionado con la recuperación de los aislados de pacientes con SIDA, que con frecuencia están expuestos a los azoles y dicha preexposición puede inducir una disminución en la sensibilidad debido al agotamiento del ergosterol en la membrana fúngica (Barchiesi et al., 2000).

Itraconazol

El itraconazol fue el fármaco que demostró tener menor actividad frente a los aislados estudiados aquí: el 92.1% de los aislados de *C. neoformans* y el 83.3% de *C. gattii* superaron los VCE. Las MG tan altas de las CMI que se obtuvieron en este estudio no se han reportado anteriormente en especies del complejo, por lo que sería interesante realizar un estudio prospectivo sobre la relación de la evolución de la criptococosis directamente con el expediente de los pacientes de quienes se obtuvieron los aislados que presentaron tan poca sensibilidad a este fármaco para dilucidar este fenómeno, y de igual manera, monitorear con el uso de secuenciación genética el surgimiento de nuevas mutaciones que pudieran estar implicadas en el decaimiento de la sensibilidad y por ende en el aumento de la virulencia de las cepas de *C. neoformans/C. gattii*.

Fluconazol

Las CMI de FLZ que González y cols. (González et al., 2016) reportaron para los aislados de *C. neoformans* y *C. gattii* son menores que los que se obtuvieron en este estudio. Estos valores superiores a los datos reportados en distintas partes del mundo, pueden ser resultado de una disminución de la sensibilidad de las cepas de *Cryptococcus* spp conforme transcurre el tiempo por la aparición de nuevas mutaciones atribuidas a una presión selectiva. En un estudio realizado en la Ciudad de México (Castañón-Olivares et al., 2009), el rango de la CMI de FLZ fue de 0.25 a 32 µg/mL, datos que coinciden en el límite superior (32 µg/mL) de los valores de CMI en este estudio; sin embargo, el valor más bajo para FLZ fue de 1 µg/mL, lo que apoya la noción de una disminución en la sensibilidad de los aislados del complejo *C. neoformans/C. gattii*.

En este estudio un aislado de *C. gattii* y uno de *C. neoformans* en presencia de FLZ superaron los VCE. Entre los factores asociados a los fracasos terapéuticos y la emergencia de resistencias de las especies pertenecientes al complejo *C. neoformans/C. gattii* al fluconazol se incluyen la ausencia de actividad antifúngica del FLZ por la asociación con otros fármacos y niveles séricos inadecuados de éste. Gran parte de la fuerza impulsora detrás de las preocupaciones sobre la resistencia antifúngica emergente en las especies pertenecientes al complejo *C. neoformans/C. gattii* ha sido el uso extensivo de fluconazol como agente en la terapia de mantenimiento antifúngico crónico y la profilaxis antifúngica primaria en pacientes con SIDA (Smith et al., 2015; Chen et al., 2015).

Posaconazol

El posaconazol no es un agente antifúngico que sea administrado rutinariamente para el tratamiento contra la criptococosis, sin embargo, autores como Hong y colaboradores (2018) han reportado la

buena actividad antimicrobiana *in vitro* que tuvo frente a aislados de *C. neoformans*, lo que coincide con los resultados aquí obtenidos, motivando a pensar que pudiera ser una alternativa en el tratamiento contra la criptococosis, después de estudiar la correlación de la actividad *in vivo* - *in vitro*.

Ketoconazol

El Ketoconazol no está indicado para el tratamiento contra la criptococosis, pero se incluyó en este estudio para reportar su actividad, y como caso similar al posaconazol, para dilucidar su posible uso alternativo contra esta micosis. En el estudio ya mencionado de Castañón-Olivares y colaboradores (2009), el rango de la CMI que ellos obtuvieron fue de 0.03 a 0.5 µg/mL para KTZ, lo que coincide con los valores que se obtuvieron aquí. Debido a la alta sensibilidad por parte de los aislados estudiados parecería que el uso de ketoconazol no debería limitarse como tratamiento de esta micosis, sin embargo debe siempre tenerse en cuenta el alto efecto hepatotóxico que puede causar.

Bastos y cols. (2017) postularon que los pesticidas pueden ser los responsables de las alteraciones en la sensibilidad de estas levaduras a azoles (itraconazol, fluconazol) debido a la exposición del nicho ecológico de los principales agentes etiológicos de la criptococosis a ciertos agroquímicos como el tebuconazol.

Sionov y cols. (2009) y el grupo de trabajo de Varma y Kwon-Chung (2010) han reportado que tanto *C. neoformans* como *C. gattii* presentan heterorresistencia innata a azoles, caracterizada porque una subpoblación tolera concentraciones más altas del antifúngico azólico, lo que puede explicar las altas CMIs a los azoles y los patrones de resistencia observados en este trabajo (**Fig. 10**): se encontraron 13 aislados resistentes al posaconazol, dato interesante pues es un fármaco de “nueva generación”, es decir, no hay fundamento para pensar en la existencia de resistencia secundaria ya que pocos casos clínicos han sido tratados con este fármaco.

5-flucitosina

La 5-flucitosina es uno de los antifúngicos que más se usan para el tratamiento contra la criptococosis en combinación con otros antifúngicos como AMB, sin embargo en la mayoría de los países de América Latina no se distribuye. Los reportes de su actividad antifúngica frente a las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* señalan que es baja, aunque los casos de resistencia son raros (Herkert et al., 2016). Las CMIs reportadas alrededor del mundo abarcan un amplio rango que va desde ≤0.125 µg/mL, hasta los 16 µg/mL; similar a este estudio, donde los rangos de CMIs para *C. neoformans s.l.* y *C. gattii s.l.* fueron 0.25 – 64 µg/mL y 0.5 – 8 µg/mL, respectivamente. Un aislado de *C. neoformans* y uno de *C. gattii* fueron resistentes, lo cual, partiendo de la premisa de que en México no se distribuye este fármaco, se supone que los aislados no habían sido sometidos anteriormente a este antifúngico; por lo que los resultados incentivan a seguir actualizando estos datos

epidemiológicos, ya que probablemente estos aislados fueron adquiridos de pacientes con previo tratamiento con 5-FC, o que estos aislados presentan resistencia innata.

Tomando como referencia la MG de los valores de las CMI_s, los aislados de *C. gattii* mostraron valores menores en comparación con los de *C. neoformans* con casi todos los antifúngicos probados, con excepción del fluconazol. En un estudio similar a este, realizado por Andrade-Silva y cols. (2013) en Brasil, los aislados de *C. gattii* también mostraron mayor sensibilidad a la mayoría de los fármacos que evaluaron. *C. gattii* afecta principalmente a pacientes aparentemente inmunocompetentes, y diversos estudios (**Cuadro 6**) han demostrado que tiene mayor sensibilidad a agentes antifúngicos como AMB, FLZ, 5-FC, en comparación con aislados de *C. neoformans*, lo cual concuerda los resultados obtenidos aquí.

Para muchas combinaciones de microorganismos y antifúngicos los puntos de corte no están disponibles, y en estos casos los valores de corte epidemiológicos (VCE) proporcionan una metodología para clasificar los aislamientos como de tipo salvaje (WT) o como no WT cuando se puede identificar aislados que presentan alguna mutación

CONCLUSIONES

- Los antifúngicos que tuvieron menor actividad en los aislados del complejo *C. neoformans/C. gattii* fueron itraconazol, fluconazol y 5-flucitosina.
- En total, el 90.91% de los aislados fue resistente a itraconazol.
- El perfil de sensibilidad antifúngica entre *C. neoformans sensu lato* y *C. gattii sensu lato* sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en presencia de posaconazol.
- Ningún aislado fúngico fue resistente a los 6 antifúngicos probados, lo que mantiene la esperanza terapéutica contra la criptococosis.
- La necesidad de avalar los puntos de corte de *C. neoformans/C. gattii* por los centros de referencia (i.e. CLSI, EUCAST) es de suma importancia ya que permitiría aclarar el panorama de la sensibilidad antifúngica de *Cryptococcus* spp.

PERSPECTIVAS

- Correlacionar los resultados *in vitro* con la respuesta del paciente de donde se aisló la levadura.
- A nivel de resistencia en términos médicos, y microevolución en términos biológicos, es importante evaluar la sensibilidad antifúngica para inferir si los cambios climáticos o las importaciones de *Eucalyptus* spp o los traslados internacionales han interferido en la distribución de *C. neoformans*/*C. gattii*.
- Debería investigarse si el incremento en la resistencia es debido a la presión de selección o si es un nuevo aislado, usando gel de electroforesis para campos pulsados o alguna otra técnica molecular.

LITERATURA CITADA

1. Alastruey-Izquierdo, A., Melhem, M., Bonfietti, L. y cols. 2015. Susceptibility Test for Fungi: Clinical and Laboratorial Correlations in Medical Mycology. *Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(19), 57-64
2. Andrade-Silva, L., Ferreira-Paim, K., Mora, D. y cols. 2013. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Medical Mycology*, 52(6), 635-640
3. Arendrup, M., Prakash, A., Meletiadis, J. y cols. 2017. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of eight antifungal compounds for *Candida auris* and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(6), 1-10
4. Barchiesi, F., Schimizzi, A., Caselli, F. y cols. 2000. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2435-2441
5. Bastos, R., Carneiro, H., Oliveira, L. y cols. 2017. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(1), e01179-17
6. Biomerieux. 2012. Summary of Etest® Performance, Interpretive Criteria, and Quality Control Ranges to reflect the CLSI 2012 standards. Recuperado de <http://www.illexmedical.com/files/E-test-Package-Insert/PerformanceInterpretiveCriteriaandQualityControlRanges.pdf>
7. Bongomin, F., Oladele, R., Gago, S. y cols. 2018. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. *Mycoses*, 61(5), 290-297
8. Calvo, B., Colombo, A., Fischman, O. y cols. 2001. Antifungal Susceptibilities, Varieties, and Electrophoretic Karyotypes of Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6), 2348-2350
9. Cantón, E., Martín, E. y Espinel-Ingroff. 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Asociación Española de Micología. *Revista Iberoamericana de Micología*.
10. Castañeda, E. y Lizarazo, J. 2012. Protocolo de estudio y manejo de los pacientes con criptococosis. *Infectio*, 16 (3S): 123-125
11. Castañón-Olivares, L., Martínez-Martínez, K., Bermúdez-Cruz, R. y cols. 2009. Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Medical Mycology*, 47(7), 713-721
12. Catalán, M. y Montejo, J. 2006. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(1), 39-49
13. Chen, S., Meyer, W. y Sorrell, C. 2014. *Cryptococcus gattii* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 980-1024

14. Chen, Y., Chang, T., Liu, K. y cols. 2015. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. *BMC Infectious Diseases*, 15(277), doi: 10.1186/s12879-015-1023-8
15. Cheong, J. y McCormack, J. 2013. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? *Medical Mycology*, 51(3), 261-269, doi:10.3109/13693786.2012.715763
16. CLSI. 2018. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd. ed. CLSI guideline M44. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
17. Coelho, C., Bocca, A. y Casadevall, A. 2014. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, 87, 1-41
18. Dalyan, B., Topaç, T., Ağca, H. y cols. 2018. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution methods for determining the susceptibilities of *Candida* isolates. *Mikrobiyoloji bulteni*, 52(1), 35-48
19. Drummond, E., Reimão, J., Dias, A. y cols. 2007. Behaviour azole fungicide and fluconazole in *Cryptococcus neoformans* clinical and environmental isolates *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(2), 209-211
20. Espinel-Ingroff, A., Barchiesi, F., Cuenca-Estrella, M. y cols. 2005. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 3884-3889
21. Espinel-Ingroff, A., Canton, A., Castañón-Olivares, L. y cols. 2012. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: An International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society of Microbiology, 56(11), 5898-5906
22. Espinel-Ingroff, A., Chowdhary, A., Cuenca-Estrella, M. y cols. 2012. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: An International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B and Flucytosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 3107-3113
23. Favalessa, O., de Paula, D., Dutra, V. y cols. 2014. Molecular typing and *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 1037-1043
24. Ferreira, G., Santos, J., Costa, M. y cols. 2015. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 4600-4609
25. Firacative, C., Lizarazo, J., Illnait-Zaragozi, M. y cols. 2018. The status of cryptococcosis in Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(7), e170554

26. Fothergill, A., Rinaldi, M. y Sutton, D. 2006. Antifungal Susceptibility Testing. *Infectious Disease Clinics of North America*, 20(3), 699-709
27. González, G., Casillas-Vega, N., Garza-González, E. y cols. 2016. Molecular typing of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex from Northeast Mexico. *Folia Microbiologica*, 61(1), 51-56
28. Gutch, R., Nawange, S., Singh, S. y cols. 2015. Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1125-1133
29. Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B. y cols. 2015. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal genetics and biology*, 78, 16-48
30. Herkert, P., Hagen, F., De Oliveira, G. y cols. 2016. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(11), 1803-1810
31. Hong, N., Chen, M., Al-Hatmi, A. y cols. 2018. Genotypic diversity and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from paediatric patients in China. *Mycoses*, 62(2), 171-180
32. Kaplan, J., Benson, C., Holmes, K. y cols. 2009. Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents: Recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 58(RR-4), 1-198
33. Kwon-Chung, K., Fraser, J., Doering, T. y cols. 2014. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(7), 1-27
34. Lamb, D., Corran, A., Baldwin, B. y cols. 1995. Resistant P45051A1 activity in azole antifungal tolerant *Cryptococcus neoformans* from AIDS patients. *FEBS Letters*, 368(2), 326-330
35. Lockhart, S., Ghannouy, M. y Alexander, B. 2017. Establishment and Use of Epidemiological Cutoff Values for Molds and Yeast by Use of the Clinical and Laboratory Standards Institute M57 Standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(5), 1262-1268
36. López-Martínez, R., Córdova-Martínez, E., Bazán-Mora, E. y cols. 2014. Frecuencia de serotipos de *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* en México. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica Medicina de Laboratorio*, 61(2), 125-128
37. Mahabeer, Y., Chang, C., Naidu, D. y cols. 2014. Comparison of Etests and Vitek 2® to broth microdilution for the susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(4), 294-298
38. Mak, S., Klinkenberg, B., Bartlett, K. y Fyfe, M. 2010. Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. *Environmental Health Perspectives*, 118(5), 653-658

39. Marín, M. 2017. Fenotipificación y factores de virulencia del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* de origen clínico de algunos Hospitales de Paraguay. Tesis de Maestría.
40. MCS Diagnostics. 2012. Sensitre® YeastOne® For *in vitro* Diagnostic Use. Recuperado de http://www.mcsdiagnostics.com/site/upload/file/pdf/yo_8_yo10_v1.4_e.pdf
41. Melhem, M., Bertolotti, A., Lucca, H. y cols. 2014. Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Brazilian journal of microbiology. Brazilian Society for Microbiology*, 44(4), 1257-1266
42. Méndez-Tovar, L., Mejía-Mercado, J., Manzano-Gayosso, P. y cols. 2016. Frequency of invasive fungal infections in a Mexican High-Specialty Hospital. Experience of 21 years. *Revista médica del IMSS*, 54(5), 581-587
43. Meyer, W., Castañeda, A., Jackson, S. y cols. 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 9(2),189-195
44. Mitchell, T., Castañeda, E., Niersen, K. y cols. 2011. Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*.(ed. Heitman, J. et al.), 237-259, ASM, Washington, DC.
45. Morales, B., Trilles, L., Bertho, A. y cols. 2015. *In vitro* susceptibility testing of amphotericin B for *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* AFLP1/VNI and *Cryptococcus gattii* AFLP6/VGII by CLSI and flow cytometry. *Mycoses*, 58(5), 273-279
46. Nascimento, E., Vitali, L., Von Zeska, M. y cols. 2017. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 59(e49)
47. National Center for Biotechnology Information. Flucytosine. PubChem Compound Database; CID=3366, Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3366>.
48. National Center for Biotechnology Information. Ketoconazole. PubChem Compound Database; CID=456201, Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/456201>.
49. National Center for Biotechnology Information. Posaconazole. PubChem Compound Database; CID=468595, Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/468595>.
50. Pagnocca, F., Rodrigues, A., Nagamoto, N. y cols. 2008. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(4), 517-526
51. Pérez, C., Hernández, Y., Colella, M., Roselló, A., Hartung-de-Capriles, C., Olaizola, C., et al. 2003. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* mediante el uso del medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(2), 158-162
52. Perfect, J. y Bicanic, T. 2015. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal genetics and biology*, 78, 49-54

53. Perfect, J., Dismukes, W., Dromer, F. y cols. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 50(3), 291-322
54. Pfaller, M., Castanheira, M., Diekema, D. y cols. 2011. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71(3), 252-259
55. Rivera, R. 2012. Tendencia epidemiológica de las infecciones por *Cryptococcus neoformans*, en un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México: 1990-2011. Tesis de Especialidad en Medicina Interna. Ciudad de México. 1-95
56. Ruiz-Camps, I. y Cuenca-Estrella, M. 2009. Antifúngicos para uso sistémico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(6), 353-362
57. Sánchez, S., García, J. y Marcillo, J. 2017. Sensibilidad antifúngica de *Cryptococcus neoformans* al fluconazol en pacientes con VIH y síndrome neurológico. *Investigaciones Cualitativas en Ciencia y Tecnología*, ISBN 978-84-948577-1-3, 311-320
58. Sionov, E., Chang, Y., Garraffo, M. y cols. 2009. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 2804-2815
59. Smith, K., Achan, B., Hullsiek, K. y cols. 2015. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7197-7204
60. Souza, L., Fernandes, O., Kobayashi, C. y cols. 2005. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia City, Goiás, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47(5), 253-256
61. Tello, M., Gutiérrez, E., Béjar, V. y cols. 2013. Criptococosis. *Revista Médica de Risaralda*, 19(2), 147-153
62. Theill, L., Frola, C., Leonardelli, F. y cols. 2018. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from different cities of Argentina. *International Journal of Infectious Diseases*, 73, 275
63. Torales, V. 2014. Combinación de antifúngicos de la sensibilidad/resistencia *in vitro* en aislados clínicos de *Fusarium* spp. (Tesis de licenciatura), UNAM, México.
64. van Duin, D., Casadevall, A. y Nosanchuk, J. 2002. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3394-400
65. Varma, A. y Kwon-Chung, K. 2010. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2303-2311
66. Velagapudi, R., Hsueh, Y., Geunes-Boyer, S., Wright, J. y Heitman, J. 2009. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(10), 4345-4355

67. Vu, K., Thompson, G., Roe, C. y cols. 2018. Flucytosine resistance in *Cryptococcus gattii* is indirectly mediated by the FCY2-FCY1-FUR1 pathway. *Medical mycology*, 56(7), 857-867
68. Whitney, L. y Bicanic, T. 2015. Treatment Principles for *Candida* and *Cryptococcus*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(6), a024158
69. Zapata-González, F. y Cardona-Castro, N. 2012. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Revista CES Medicina*, 26(1), 71
70. Kwon-Chung, K., Bennett, J., Wickes, B. y cols. 2017. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *American Society for Microbiology*, 2(1), 1-7
71. Wang, L. y Lin, X. 2011. Mechanisms of unisexual mating in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(7), 651-660