

CRIPCOCOCOSIS POR *CRYPTOCOCUS GATTII*. EVIDENCIAS DE LA INTRODUCCIÓN DE ESTA MICOSIS EMERGENTE EN CUBA

Autor principal: Dra. María Teresa Illnait Zaragoza¹

Otros autores: Gerardo F. Martínez Machín, Carlos M. Fernández Andreu, Ernesto X. Monroy Vaca, Mayda R. Perurena Lancha, Iraida Rodríguez Gutiérrez, José L. Polo Leal, Lilian M. Ortega González, Antonio Valdés Ramos, Magela García Montero y Yizy Rivera Gallego

Colaboradores: Jacques FGM Meis, Ferry Hagen, Teun Boekhout y Alina Llop Hernández

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, La Habana, Cuba, PO Box: 601, Marianao 13. Teléfono: 255-3524 / 255-3520. Fax. 204-6051

Otra entidad participante: Laboratorio de Microbiología, Parque Zoológico Nacional

¹Autor de correspondencia. Correo electrónico mtillnait@ipk.sld.cu / mtillnait@infomed.sld.cu

Dra. María Teresa Illnait Zaragoza (30%). Participó en la concepción y diseño de los trabajos, en la ejecución de los mismos, en el análisis de los resultados obtenidos y redactó tres de los manuscritos publicados.

Dr. Gerardo F. Martínez Machín (10%). Participó en la concepción del trabajo, en el análisis de los resultados obtenidos y en la revisión de los manuscritos publicados.

DrC. Carlos M. Fernández Andreu (10%). Participó en la concepción del trabajo, en el análisis de los resultados obtenidos y en la revisión de los manuscritos publicados.

Lic. Ernesto X. Monroy Vaca (8%). Contribuyó con las tareas relacionadas con los estudios moleculares y en la revisión de los manuscritos publicados.

Lic. Mayda R. Perurena Lancha (8%). Contribuyó con algunas tareas relacionadas con la identificación convencional y en la revisión de los manuscritos publicados.

Téc. Iraida Rodríguez Gutiérrez (8%). Contribuyó con algunas tareas relacionadas con el aislamiento e identificación convencional.

Lic. José L. Polo Leal (6%). Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo y redactó uno de los manuscritos publicados.

Dra. Lilian M. Ortega González, MSc (6%). Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo y en la revisión de los manuscritos publicados.

Lic. Antonio Valdés Ramos, MSc (6%). Contribuyó con tareas de la fase experimental del trabajo.

Lic. Magela García Montero (4%). Contribuyó con tareas de la fase experimental del trabajo.

Dra. Yizy Rivera Gallego (4%). Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo.

RESUMEN

Antecedentes: Esta propuesta está basada en los primeros hallazgos de *Cryptococcus gattii* en Cuba y las evidencias que apuntan hacia su posible introducción en este país desde zonas endémicas. Los trabajos anteriormente presentados (2005 y 2011) estuvieron fundamentados en los aportes realizados por los mismos autores al conocimiento de *Cryptococcus neoformans* como principal agente causal de la criptococosis en Cuba.

Problema a resolver y objetivos del trabajo: A nivel mundial existe gran preocupación por la epidemia ocasionada por *C. gattii*, la que hasta ahora se conoce como el mayor evento epidémico causado por un agente fúngico. Cuba presenta condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de esta levadura; adicionalmente debe considerarse su posible introducción desde zonas endémicas, la emergencia de genotipos más virulentos y su evidente adaptación a nuevos ambientes. Estas dos últimas condiciones le han valido para que se le considere como micosis emergente a nivel mundial. Ante estas condicionantes y preocupados por la gravedad del cuadro clínico que ocasiona esta levadura, el Laboratorio de Micología del IPK implementó las herramientas convencionales y moleculares para su diagnóstico y caracterización atendiendo a la susceptibilidad antifúngica y perfiles genéticos. Paralelamente se desarrollaron estudios ambientales para determinar su presencia en fuentes naturales y valorar las implicaciones clínico-epidemiológicas de los aislamientos obtenidos.

Resultados: Las técnicas empleadas permitieron identificar a la especie *C. gattii* como agente causal de infección en un guepardo importado desde Sudáfrica al Parque Zoológico Nacional de Cuba y en un paciente cubano a su regreso después de visitar Honduras y Guatemala. A pesar de que los aislamientos mostraron susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de elección para el tratamiento de esta micosis y otros de más reciente generación, ambos casos resultaron fatales, lo cual demuestra la gravedad de la infección y la importancia de realizar

un diagnóstico precoz. Los estudios ambientales y de epidemiología molecular sugieren que ambos arribaron a Cuba siendo portadores de una infección latente adquirida previamente. A pesar de la falta de evidencias sobre la presencia de *C. gattii* en las fuentes naturales muestreadas hasta el momento, no se descarta su presencia en esta isla.

Conclusiones: Estos resultados representan los primeros aislamientos de *C. gattii* en Cuba lo que demuestra la introducción de este microorganismo emergente en el país y su asociación con la estancia en zonas endémicas. Se confirma la letalidad de esta infección y la necesidad de alertar sobre esta situación al personal que pudiera estar implicado en el diagnóstico y manejo de los pacientes afectados. En general, estos resultados evidencian la capacidad del Laboratorio de Micología del IPK para el diagnóstico de esta micosis. El conocimiento de los mismos y divulgación deberán redundar en un mejor control de la infección en beneficio de los individuos susceptibles.

COMUNICACIÓN CORTA

La criptococosis constituye una micosis que compromete seriamente la vida de los pacientes afectados. Resulta de la inhalación de levaduras o esporas presentes en el ambiente. La infección pulmonar puede ser rápidamente eliminada, progresar hacia una infección fulminante o persistir asintomática por largos períodos de latencia y luego diseminarse a través del torrente sanguíneo hasta el sistema nervioso central causando meningoencefalitis y muerte si no es tratada de forma oportuna¹. Se estima que a nivel mundial son diagnosticados cada año aproximadamente 1 millón de casos nuevos de los cuales más de la mitad fallecen, y que en países subdesarrollados es la causa más frecuente de meningitis acarreado al menos tantas muertes como la tuberculosis y la malaria^{1,2}.

Esta micosis es causada por dos especies emparentadas: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, hoy consideradas como un complejo de especies. La primera de estas se encuentra ampliamente distribuida en todas las latitudes, se relaciona de forma estrecha con excretas de aves, especialmente de palomas y suele afectar a personas inmunodeprimidas, siendo la principal responsable de los cuadros de criptococosis en pacientes con sida. En contraposición, *C. gattii* se reconoce en la actualidad como patógeno primario capaz de afectar tanto a humanos como a diferentes especies de animales residentes en climas tropicales y subtropicales, los cuales suelen infectarse a partir de la inhalación de propagulos presentes en detritos vegetales^{3,4}. A partir de 1999 esta última especie emergió como causa de criptococosis en la isla de Vancouver, Canadá donde no había sido reportado con anterioridad. En este nuevo escenario causó una epidemia aún no controlada y hasta el 2009 se habían documentado más de 500 casos humanos y más del doble de animales domésticos enfermos por esta causa, siendo ésta la incidencia más elevada reportada a nivel mundial. Los estudios moleculares demostraron que la actual

epidemia es originada por genotipos más virulentos y actualmente se expande a diferentes estados de los Estados Unidos de Norteamérica^{2,5,6}.

En Cuba, la criptococosis fue reportada por primera vez a inicios de la década de 1950, generalmente asociada con el alcoholismo y otras condiciones debilitantes⁷. Desde 1986, con el diagnóstico del primer paciente con sida en este país, el número de casos diagnosticados en el laboratorio de micología del IPK (LM-IPK), se ha mantenido sin grandes variaciones observándose un incremento progresivo a partir del 2004 a pesar de la introducción de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) (datos del libro de registro del LMIPK). Hasta el momento, los aislamientos clínicos y ambientales cubanos han correspondido con la especie *C. neoformans* var. *grubii*⁸. No obstante, dado i) que Cuba presenta todas las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de *C. gattii*, ii) la posible introducción de este agente desde zonas endémicas, iii) la gravedad del cuadro que ocasiona, iv) la reciente emergencia de genotipos más virulentos, v) la evidente adaptación del agente a nuevos ambientes, vi) la falta de sospecha clínica y de experiencia en cuanto al manejo de los pacientes afectados por esta levadura, así como vii) las dificultades que ofrece su diferenciación microbiológica, el LMIPK enfrentó el reto de la implementación de las herramientas convencionales y moleculares para la detección y la caracterización de esta especie. Estas permitieron la identificación de *C. gattii* por primera vez en Cuba y la posible asociación de la infección con la visita a áreas endémicas. El conocimiento y divulgación de estos resultados deberá contribuir a un mejor control de la infección en beneficio de los individuos susceptibles.

Breve descripción de los principales resultados alcanzados

I. Evidencias de infección por *C. gattii* en un guepardo (*Acinonyx jubatus*) del Parque Zoológico Nacional de Cuba y en un paciente cubano

En Cuba hasta el momento el 100 % de los aislamientos obtenidos a partir de muestras clínicas corresponden a la especie *C. neoformans* var. *grubii* independientemente del estado inmunológico, la edad, sexo, procedencia y color de la piel del paciente⁸. La falta de síntomas y signos patognomónicos que identifiquen esta infección sumado al bajo índice de sospecha clínica, ponen en riesgo su diagnóstico oportuno, pilar imprescindible del éxito terapéutico. Esta situación suele agravarse en los pacientes con criptococosis por *C. gattii* ya que existen evidencias de la elevada relación entre la infección por esta levadura y el peor pronóstico de la enfermedad a pesar del empleo de regímenes terapéuticos más agresivos y prolongados⁴. Los casos que se describen brevemente a continuación constituyen los primeros diagnósticos de infección por *C. gattii* en Cuba.

Infección por *C. gattii* en un guepardo del Parque Zoológico Nacional de La Habana, Cuba: El animal se trataba de un ejemplar hembra de aproximadamente 12 meses de edad procedente de Sudáfrica, el cual había sido ubicado en exhibición en el área de carnívoros del parque. Después de 16 meses en

cautiverio, comenzó a presentar pérdida de peso, astenia, anorexia, dificultad respiratoria y abundante secreción nasal. Por este motivo fue trasladada a la clínica veterinaria del centro para su mejor observación y tratamiento donde no se constataron manifestaciones clínicas en otros órganos o sistemas. Se tomaron muestras de las secreciones nasales las que fueron cultivadas paralelamente en agar sangre y agar de Sabouraud. Los crecimientos obtenidos se enviaron al LM-IPK para su identificación mediante métodos convencionales (observación de cápsula en tinta china, producción de ureasa, prueba de filamentación en agar harina de maíz, asimilación de inositol, producción de fenoloxidasa y crecimiento en el medio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol)⁹ y serológicos (aglutinación en lámina empleando el juego comercial Crypto Check; Iatron Laboratories, Tokio, Japón). Estas herramientas permitieron identificar el aislamiento como *C. gattii* serotipo B. Desafortunadamente el animal falleció súbitamente antes de completar el proceso de identificación.

Infección por *C. gattii* en un paciente cubano inmunocompetente: La historia se refiere a un hombre de 56 años procedente de Villa Clara, Cuba, fumador y bebedor moderado sin otros antecedentes patológicos significativos. Como dato epidemiológico de interés se cita su estancia en Honduras (2003-2005) y Guatemala (2007-2009). Aproximadamente 17 meses después de su regreso a Cuba presenta fiebre, dolores musculares, malestar general y dolor de cabeza acompañando a un cuadro respiratorio el cual es tratado de forma empírica con penicilina. Una semana más tarde el paciente fue ingresado por el empeoramiento de los síntomas y signos. Entre los estudios realizados se logró el aislamiento de una levadura a partir del líquido cefalorraquídeo, la cual fue enviada al LM-IPK para su identificación. Mediante el empleo de los métodos convencionales descritos en el caso anterior, el aislamiento fue clasificado como *C. gattii*. El paciente fue trasladado a la unidad de cuidados intensivos del IPK donde recibió asistencia médica especializada. En el transcurso de su evolución recibió tratamiento específico con anfotericina B liposomal, fluconazol, itraconazol, voriconazol, así como adyuvantes (interferón gamma e inctaglobin) y de soporte de acuerdo a su condición clínica y las normas vigentes internacionalmente¹⁰. A pesar de todos los esfuerzos realizados el paciente falleció un año después de iniciado los síntomas.

Confirmación de la identificación de los aislamientos mediante métodos moleculares: Con este objetivo se analizaron los perfiles genéticos teniendo en cuenta las tallas de fragmentos polimórficos del genoma previamente amplificados (AFLP, de sus siglas en inglés) según recomienda la literatura internacional¹¹. Esta herramienta permitió corroborar la identificación inicial de ambos aislamientos y conocer su tipo genético: AFLP 4 (aislamiento del guepardo) y AFLP 5 (aislamiento humano). Esta información de conjunto con la historia epidemiológica de cada caso dio pie a hipotetizar sobre la posible introducción de *C. gattii* en Cuba a partir de zonas donde la infección por esta levadura ha sido reportada previamente.

Estas evidencias demuestran la presencia de *C. gattii* en Cuba y la necesidad de alertar a todo el personal que pueda estar involucrado la atención médica y el diagnóstico microbiológico con vistas a elevar la sospecha clínica y lograr un diagnóstico oportuno.

II. Estudio de la susceptibilidad in vitro de los aislamientos de *C. gattii* obtenidos a partir del guepardo y del paciente frente a siete antifúngicos

El régimen de antifúngicos recomendado para el tratamiento de la meningoencefalitis y la enfermedad diseminada por *C. neoformans* incluye tres fases: inducción, consolidación y mantenimiento. La combinación de anfotericina B (Anf B) y 5-fluorocitosina (5FC) en la primera, seguido del uso del fluconazol (Flu) en las dos últimas, es la más asociada al éxito terapéutico. A pesar de que el itraconazol (Itr) resulta menos efectivo en estos casos, la presencia de intolerancia a las drogas de elección o la carencia de las mismas, justifican su empleo. En el curso de la infección por *C. gattii* se recomienda básicamente el mismo régimen que para *C. neoformans*¹⁰.

De acuerdo con las pautas citadas, se seleccionaron las drogas para la determinación de la susceptibilidad antifúngica in vitro. También se evaluaron otros medicamentos de más reciente generación: voriconazol (Vor), posaconazol (Pos) e isavuconazol (Isa). Se empleó el método de microdilución en medio líquido de acuerdo al documento M27-A3 del 2008 dictado por el Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI, de sus siglas en inglés) el cual es considerado como método de referencia¹². Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada droga frente a los aislamientos obtenidos a partir muestra humana y animal así como su media geométrica. Los valores de cortes se evaluaron siguiendo los criterios recientemente establecidos por Espinel-Ingroff y cols.^{13, 14}.

De forma general ambos aislamientos mostraron patrones uniformes de susceptibilidad a los antifúngicos estudiados y no se detectó resistencia a los mismos (anexo, tabla 1). El análisis de la MG de los valores de CMI de cada antifúngico muestra que Isa y Pos son los antifúngicos con actividad in vitro más potente frente a los aislamientos estudiados. Le siguieron en orden decreciente Itr y Anf B, en tanto que 5FC y Flu fueron los de menor actividad.

La interacción entre las drogas antifúngicas y el hospedador, entre el hongo y el hospedador y entre la droga y el hongo es un proceso complejo, por lo que las pruebas de susceptibilidad in vitro solo proveen una parte de la información necesaria para predecir el desenlace del tratamiento. Sin embargo, el desarrollo de los métodos estandarizados para determinar la susceptibilidad, constituyen un notable avance. Estas pruebas contribuyen de forma significativa a la elección del tratamiento más apropiado, especialmente en las infecciones que comprometen la vida del paciente. Tanto Isa como Pos, pertenecen a la generación de azoles más reciente y están siendo investigados para el tratamiento de infecciones fúngicas graves. Además de la elevada eficacia observada, son bien tolerados, presentan

menor toxicidad que otros antimicóticos sistémicos y su farmacodinámica se caracteriza por una lenta eliminación y amplia distribución en los tejidos. Isa además, tiene la ventaja de estar disponible tanto para uso oral como parenteral¹⁵. Los mismos pudieran ser una alternativa terapéutica eficaz en el tratamiento de la criptococosis por *C. gattii*.

III. Caracterización genotípica de los aislamientos obtenidos a partir de muestras clínicas (animal y humana)

El diagnóstico microbiológico de la criptococosis se basa en métodos fenotípicos los cuales son laboriosos, consumidores de tiempo y en ocasiones imprecisos debido a la subjetividad en la interpretación de los resultados¹⁶. Las herramientas moleculares por su parte, permiten la identificación de las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* y otras descritas con menor frecuencia proporcionando resultados más completos con lo cual contribuyen a una mejor comprensión de la epidemiología y la historia natural de la criptococosis.

En el análisis de los aislamientos de *C. gattii* incluidos en este trabajo se empleó el AFLP y la secuenciación de fragmentos nucleotídicos multilocus (MLST, de sus siglas en inglés). Estas de conjunto, permitieron no solo confirmar los resultados obtenidos por los métodos convencionales, sino también conocer el genotipo de cada aislamiento y comparar los mismos con otros aislamientos de su tipo (anexo, figura 1a y 1b).

La implementación de estas técnicas constituye una herramienta de invaluable valor. En los casos evaluados aquí permitieron arribar a conclusiones sobre el origen de la infección y la posible introducción en Cuba de un nuevo microorganismo emergente que ocasiona infección fatal tanto en animales como en humanos.

IV. Aislamiento y caracterización de especies de *Cryptococcus* a partir de detritos vegetales

Estudios epidemiológicos previamente realizados en el LMIPK a partir de aislamientos de *C. neoformans* obtenidos de muestras clínicas y excretas de palomas demostraron que solo algunos de los genotipos encontrados en ambos tipos de muestras se encuentran estrechamente relacionados⁸. Esto sugiere que los aislamientos clínicos estudiados pudieron originarse en fuentes ecológicas adicionales diferentes de las excretas de palomas.

Teniendo en cuenta este antecedente y que actualmente los detritos vegetales son considerados el nicho ecológico primario del complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*,¹⁷ así como la falta de evidencias sobre la existencia de esta última especie en Cuba, se recolectaron 662 muestras de este tipo a partir de 331 árboles y cactus en La Habana, Cuba. La selección inicial de los aislamientos estudiados estuvo basada en técnicas convencionales ya mencionados en el acápite I. La confirmación se realizó mediante el análisis del polimorfismo de la

longitud de fragmentos amplificados (AFLP, de sus siglas en inglés) y secuenciación de los fragmentos ITS1/5.8S/ITS2 y D1–D2 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés)¹¹.

La identificación convencional arrojó la presencia de 182 aislamientos pertenecientes al complejo de especies *C. neoformans/C. gattii*, de los cuales 61 correspondieron a *C. gattii*. El análisis molecular demostró que solo uno de estos aislamientos coincide con *C. neoformans* var. *grubii*. La especie más prevalente en este estudio fue *Cryptococcus heveanensis* (33%) y 65 aislamientos segregados en 10 agrupaciones resultaron no tipables y se consideran posibles nuevas especies (anexo, figura 2).

Estos resultados evidencian la baja especificidad de los métodos convencionales para el análisis de muestras ambientales y la necesidad de herramientas moleculares para la confirmación de los resultados. Hasta el momento los nichos ecológicos responsables de la infección criptocócica en Cuba continúan siendo un enigma y la no detección de *C. gattii* en las muestras estudiadas no descartan su presencia en la isla.

Novedades:

Estos resultados representan los primeros aislamientos de *C. gattii* en Cuba lo que sugieren la introducción de este microorganismo emergente en el país.

Se evidencia la capacidad del Laboratorio de Micología del IPK para el diagnóstico de la infección por *C. gattii* y la caracterización de este agente.

Aportes científicos:

Aunque no se descarta la presencia de *C. gattii* en Cuba, los análisis moleculares y los estudios ambientales sugieren que los casos comprendidos en este trabajo presentan una fuerte asociación con la estancia en zonas endémicas de infección por esta levadura.

El conocimiento aportado por el presente estudio permite predecir el cuadro clínico-epidemiológico y la posible respuesta al tratamiento durante la infección por *C. gattii* en Cuba.

El mal pronóstico de la enfermedad a pesar de no detectarse resistencia a los antifúngicos de primera línea y otros de más reciente generación, constituyen una alerta al personal de salud y sobre la necesidad de investigar sobre nuevas alternativas terapéuticas para el manejo de esta infección.

Beneficio social:

El conocimiento y divulgación de estos resultados contribuirá a un mejor control de la infección en beneficio de los individuos susceptibles.

Referencias bibliográficas

- (1) Harris JK, Lockhart SR, Chiller T. *Cryptococcus gattii*: where do we go from here? *Med Mycol* 2012; 50: 113-29. Doi: 10.3109/13693786.2011.607854
- (2) Marr KA. *Cryptococcus gattii* as an important fungal pathogen of western North America. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10(6): 637-643. Doi:10.1586/eri.12.48.
- (3) Springer DJ, Phadke S, Blake R, Heitman J. *Cryptococcus gattii*, no longer an accidental pathogen. *Curr Fungal Infect Rep* 2012; Doi: 10.1007/s12281-012-0111-0
- (4) Rolston K. Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. *Clin Infect Dis* 2013: 1-3. Doi: 10.1093/cid/cit342.
- (5) Datta K, Bartlett KH, Baer R, Byrnes E, Galanis E, Heitman J *et al*. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(8): 1185-1191.
- (6) Pyrgos V, Seitz AE, Steiner CA, Prevots DR, Williamson PR. Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997–2009. *PLoS ONE* 2013; 8(2): e56269. Doi:10.1371/journal.pone.0056269.
- (7) Curbelo A. Septicemia y meningitis a *Cryptococcus neoformans*. *Arch Hosp Univ (Cuba)* 1951; 9: 324-330.
- (8) Illnait-Zaragozi MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Boekhout T, Meis JF, Klaassen CH. Microsatellite typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. *PLoS ONE* 2010; 5 (2): e9124. Doi:10.1371.
- (9) de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Baarn/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2012.
- (10) Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, *et al*. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 291-322.
- (11) Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Dromer F, *et al*. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2001; 147: 891-907.
- (12) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27–A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
- (13) Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Govender N, *et al*. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 2012a; 56: 3107-3113.
- (14) Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Córdoba S, *et al*. *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. *Antimicrob Agents Chemother* 2012b; 56(11): 5898-906.

(15) Illnait-Zaragozi MT, Martínez-Machín GF, Curfs-Breuker I, Fernández-Andreu CM, Boekhout T, Meis JF. In vitro activity of the new azole isavuconazole (BAL4815) compared with six other antifungal agents against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuba. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52 (4): 1580-2.

(16) Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. Clin Chest Med 2009; 30: 391-408.

(17) Lazera MS, Salmito MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol 2000; 38: 379-83.

Anexos

(Breve descripción de los principales resultados alcanzados)

Tabla 1. Comportamiento de la susceptibilidad de los aislamientos de <i>C. gattii</i> estudiados frente a siete antifúngicos							
Aislamientos	CMI (mg/L)						
	Anf B	5FC	Flu	Itr	Vor	Isa	Pos
Humano*	0,12	8	4	0,12	0,01	0,01	0,01
Animal	0,12	1	2	0,12	0,06	0,01	0,01
MG	0,12	2,82	2,82	0,12	0,02	0,01	0,01
Valores de corte	0,5-1 ¹³	4-16 ¹³	4-8 ¹⁴	0,12-0,5 ¹⁴	0,03-0,12 ¹⁴	-	0,06-0,12 ¹⁴

CMI: Concentración mínima inhibitoria
 MG: Media Geométrica
 * Los dos aislamientos humanos presentaron patrón idéntico de susceptibilidad
 Anf B: anfotericina B; 5FC: 5-fluorocitosina; Flu: fluconazol; Itr: itraconazol; Vor: voriconazol; Pos: posaconazol

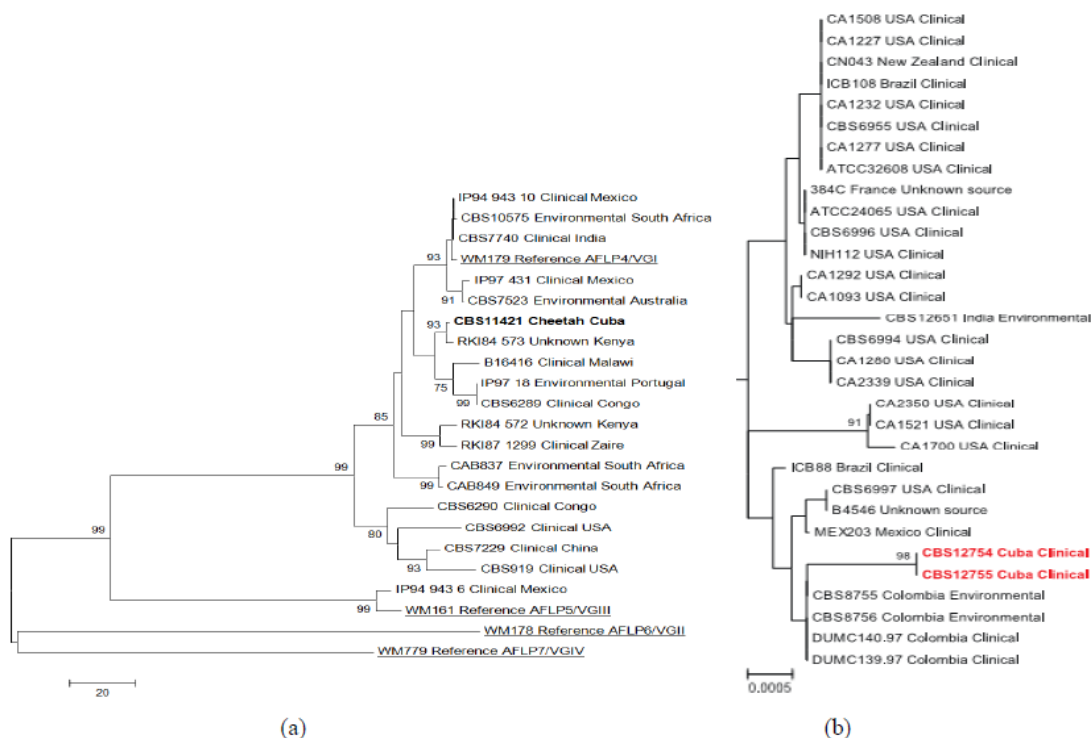


Figura 1. Análisis filogenético de los aislamientos estudiados. Los dendogramas fueron contruidos según el método de UPMAN con el empleo del coeficiente de correlación de Pearson. La comparación con otros aislamientos correspondientes a los mismos genotipos o no demostró la estrecha relación genética del aislamiento del guepardo (a) con otros de la misma región de origen del animal, así como del aislamiento humano (b) con aquellos reportados en Colombia, país vecino de Guatemala y Honduras.

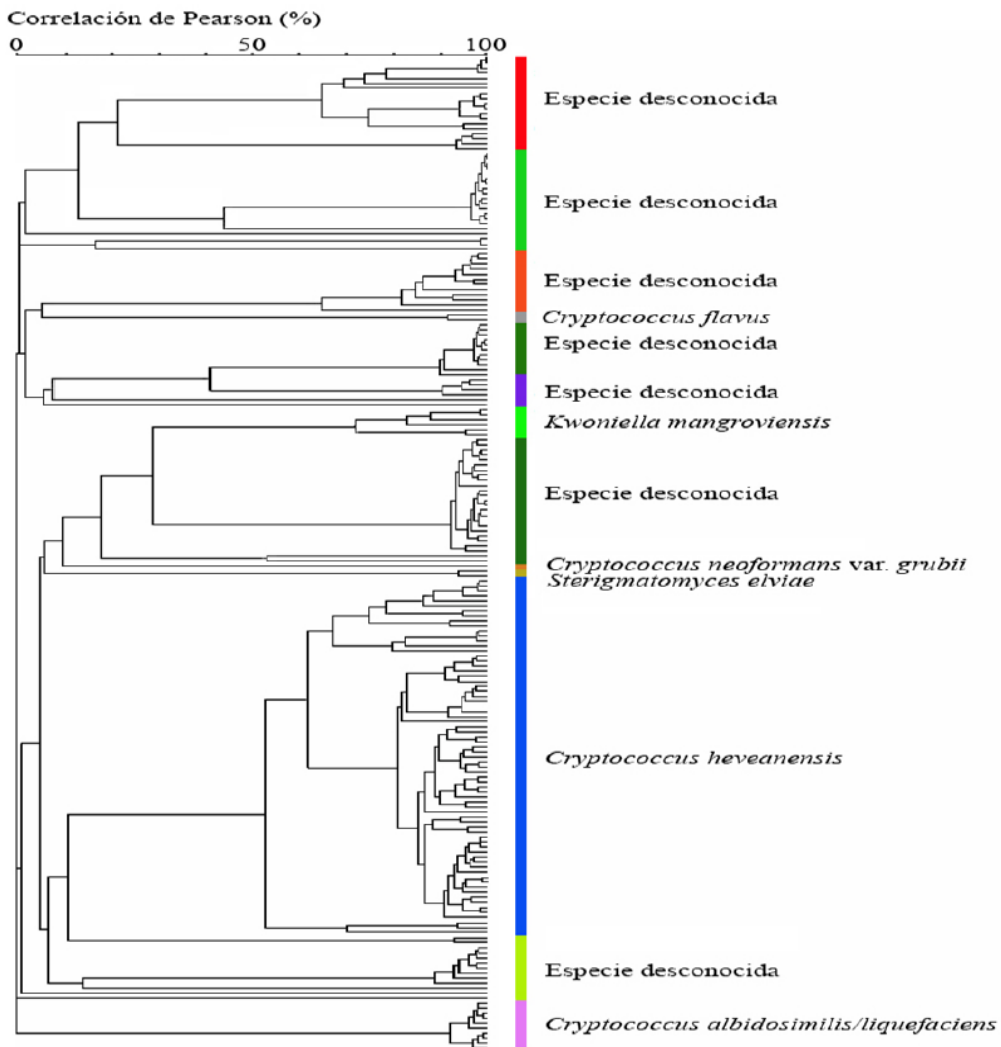


Figura 2. Dendrograma de las huellas genéticas por AFLP de los aislamientos obtenidos a partir de fuentes vegetales identificados previamente como especies del complejo *C. neoformans/C. gattii*. El mismo se construyó según el método de UPMAN con el empleo del coeficiente de correlación de Pearson. Las principales agrupaciones genéticas y sus correspondientes identificaciones mediante secuenciación de ITS1-5.8S-ITS2/D1-D2 se encuentran simbolizadas por las barras de diferentes colores.