



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DEL NORDESTE



FACULTAD  
DE MEDICINA

## ***Maestría en Micología Médica***

**Fenotipificación y factores de virulencia del complejo**

***Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* de**

**origen clínico de algunos Hospitales de Paraguay**

**Maestrando**

**Martha Rosa Lourdes Marín Ricart**

**Director**

**Prof. Dr Luis Antonio Merino**

**Asesor**

**MSc Gustavo Aguilar Fernández**

**Año 2.017**

***A mi familia, por su apoyo incondicional e  
impulsores de mis sueños***

## Agradecimientos

*“La gratitud es el estado más sublime del género humano”*

No me alcanzarían las páginas para agradecer a tanta gente que sin interés alguno contribuyó de una u otra manera para que éste trabajo se haga una realidad. No obstante, hay nombres que no puedo dejar de mencionar.

A mi director de tesis el Prof Dr Luis Antonio Merino por sus orientaciones y paciencia, mi eterno agradecimiento, admiración y cariño.

A mi asesor de tesis el MSc Gustavo Aguilar Fernández por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

A la gran familia de colegas que me han animado y me dieron todo su apoyo. De manera especial a la Esp Juana Ortellado, MSc Herminia Pérez, MSc Juan Irala, Dra Olga Heinichen, Bioq. Sonia Isaurralde, Esp. María Gloria Alonso, Esp. Ruth González, Bioq. Martin Olmedo que siempre estuvieron a mi lado.

En fin, a todos los que me han alentado, ¡y me han dicho...tú puedes!!! ¡¡¡Gracias!!!

# Índice

	Pág.
Resumen	3
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1. 1. Epidemiología	5
1. 2. Especies de <i>Cryptococcus neoformans</i> complex	7
1. 3. Morfología macroscópica en medios comunes	8
1. 4. Factores de virulencia	9
1. 4. 1. Crecimiento a 37°C	10
1. 4. 2. Cápsula polisacárida	10
1. 4. 3. Fenoloxidasa	11
1. 4. 4. Ureasa	12
1. 4. 5. Fosfolipasa	12
1. 4. 6. Proteinasa	12
1. 5. Justificación	13
1. 6. Hipótesis	14
1.7. Objetivos	15
1. 7. 1. Objetivos generales	15
1. 7. 2. Objetivos específicos	15
<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>16</b>
2. 1. Flujograma de trabajo	17
2. 2. Aislamientos	18
2. 3. Datos epidemiológicos	18
2. 4. Identificación del complejo <i>Cryptococcus neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	21
2. 4. 1. Características morfológicas en agar Sabouraud y agar papa	21
2. 4. 2. Identificación en equipos automatizados	21
2. 4. 3. Diferenciación de especies	21

2. 5. Pruebas de virulencia	21
2. 5. 1. Crecimiento a 37°C	21
2. 5. 2. Tamaño capsular y diámetro celular	22
2. 5. 3. Producción de fenoloxidasa en agar semilla de girasol	22
2. 5. 4. Producción de ureasa	23
2. 5. 5. Actividad fosfolipasa	23
2. 5. 6. Actividad proteinasa	24
<b>3. Resultados</b>	<b>25</b>
3. 1. Datos epidemiológicos	25
3. 2. Identificación del complejo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i>	26
3. 3. Pruebas de virulencia	29
<b>4. Discusión</b>	<b>40</b>
<b>5. Conclusiones</b>	<b>44</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>45</b>
Anexos	49

## Resumen

La criptococosis es una enfermedad sistémica causada por levaduras del género *Cryptococcus*, especialmente por las del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Tiene varias presentaciones clínicas, siendo las más frecuentes la infección pulmonar y la diseminación al sistema nervioso central (meningoencefalitis). En Paraguay es escasa la información que se tiene en relación al complejo *Cryptococcus*. El objetivo de este estudio fue realizar la caracterización fenotípica y determinar los factores de virulencia asociados a los aislamientos pertenecientes al complejo *C. neoformans/C. gattii* obtenidos de muestras clínicas de pacientes atendidos en varios hospitales. Se evaluó un total de 60 aislamientos clínicos, de los cuales el 83,3% (n=50) fueron de líquido cefalorraquídeo (LCR). En el 81 % (49/60) de los pacientes fueron procedentes del departamento Central. El 66,6 % (40/60) de los aislamientos fueron de varones, siendo la relación hombre/mujer de 2:1. En el 80% (48/60) de los casos, el sida fue la principal causa predisponente; los 12 pacientes restantes presentaron una variedad de patologías de base como: lupus eritematoso sistémico (3/12), lepra (2/12), vasculitis (2/12), etilismo crónico (2/12), tumor medular (1/12), linfoma retroperitoneal (1/12), enfermedad autoinmune (1/12). Para realizar la identificación se utilizaron equipos automatizados (Phoenix 100 y MicroScan Walk Away) y la prueba en agar canavanina glicina azul de bromotimol (CGB). Se estudió el crecimiento a 37° C, la morfología en agar Sabouraud y agar papa, el grosor capsular y el diámetro celular, la actividad de la fenoloxidasa, fosfolipasa, proteinasa y la ureasa. En relación a los aislamientos, uno fue clasificado fenotípicamente como *C. gattii*, y los 59 restantes como *C. neoformans*.

Todos los *Cryptococcus* crecieron a 37 °C. El tamaño capsular inducido promedio fue de  $5,94 \pm 1,15 \mu\text{m}$  y el diámetro inducido promedio fue de  $21,8 \pm 3 \mu\text{m}$ . El tamaño de la capsula promedio en agar Sabouraud fue de  $1,43 \pm 0,33 \mu\text{m}$  y en agar papa  $1,8 \pm 0,50 \mu\text{m}$ ; el diámetro celular en agar Sabouraud fue de  $10,9 \pm 1,75 \mu\text{m}$  y en agar papa de  $9,3 \pm 1,41 \mu\text{m}$ . La producción de la enzima ureasa se detectó en el 100% de los

aislamientos, en un lapso de tiempo entre 0,5 y 3 horas. Con el agar semilla de girasol se determinó la actividad de la enzima fenoloxidasa o lacasa, encontrándose el 52% (31/60) con actividad baja, 45% (27/60) actividad media y 3% (2/60) actividad alta. La actividad enzimática de la fosfolipasa se detectó en 59 aislamientos; de estos, el 38,33 % (23/60) mostraron actividad media, el 60% (36/60) una actividad baja y solo una cepa 1,66% no mostró actividad. El 100% de los aislamientos mostró actividad baja de la enzima proteasa.

No se observó correlación del tamaño capsular con los demás factores de virulencia. Estos datos constituyen una contribución al conocimiento de las características particulares de los factores de virulencia del complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* que se aislaron a partir de materiales biológicos y a la epidemiología de la región.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Epidemiología

*Cryptococcus neoformans* es de distribución mundial; esta levadura se ha aislado de diversas fuentes ambientales, como, por ejemplo, a partir de las deyecciones de aves, trozos de madera, frutas en descomposición y diversas especies de árboles. En el caso de *C. gattii* su distribución es más restringida, y se limita a países con climas tropicales y subtropicales, pudiéndose aislarlo específicamente de árboles pertenecientes al género *Eucalyptus* (*E. camaldulensis*, *E. tereticornis*) y en los almendros (*Terminalia catappa*) (1). El hábitat de *Cryptococcus neoformans* está ligado a las palomas, puesto que es a partir de excretas desecadas de estas aves de donde se aísla principalmente en la naturaleza. La preferencia por este sustrato por parte de *Cryptococcus neoformans* se debe a su contenido de nitrógeno, como creatinina y a una elevada concentración de sales. Las levaduras pueden mantenerse viables en heces de palomas durante un período largo de tiempo, incluso años si están protegidas de los rayos del sol, ya que éstos destruyen al hongo (2).

La criptococosis se ha convertido en un problema de salud pública importante a nivel mundial, abarca todo el espectro de poblaciones de pacientes, desde el huésped en apariencia inmunocompetente sin una enfermedad de base, hasta aquellos con un inmunocompromiso grave debido a una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), por un trasplante de órgano, o por una neoplasia maligna (3). Además, se lo ha aislado en infecciones en pacientes inmunocompetentes como es el caso en el brote de Vancouver, Canadá en el año 2000 (14), por lo tanto, esta micosis ya no debe considerarse simplemente una infección oportunista. El HIV es uno de los principales factores predisponentes de criptococosis y esta micosis está dentro de los marcadores de sida. No tiene predilección por sexo, aunque en algunos trabajos se puede apreciar ligero predominio en varones, y es más frecuente en personas de 30 a 60 años de edad, y rara en niños (3)(4)(5)(6).



En un informe del Laboratorio Nacional de Referencia de Paraguay en el periodo 1993 a 2013 reporta 262 casos, los pacientes fueron la mayoría del departamento Central. Presentaron síndromes meníngeos 98 % (257 pacientes) y 5 casos con formas cutáneas. El rango de edad para adultos fue de 20 a 45 años, el 82 % hombres. Se observó 1,5 % (4 casos pediátricos). El 97,7 % (n=256) de los pacientes fueron HIV(+) (19). En un trabajo sobre aspectos epidemiológicos realizado por el Hospital Muñiz, se describieron 253 casos de pacientes con criptococosis. El 92 % se encontraba asociado a sida, del 8 % restante las causas predisponentes fueron: linfoma, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hodgkin, trasplante renal y enfermedad autoinmune tratada con corticoides. El 86 % fueron varones y el 14 % mujeres (21).

Su presentación clínica puede ser muy variable desde una colonización asintomática de las vías respiratorias hasta una diseminación de la infección a cualquier parte del organismo. La interacción de *Cryptococcus* con el huésped ha sido ampliamente estudiada debido a su capacidad para modular la respuesta inmune, replicarse en el interior de los macrófagos, diseminar desde los pulmones al sistema nervioso central, y/o permanecer en estado latente durante años. Dependiendo del sitio de la infección y el estado inmunitario del paciente las manifestaciones clínicas varían desde asintomática a enfermedad grave pudiendo amenazar la vida del individuo. Se cree que el hongo al entrar al cuerpo a través de los pulmones causa enfermedad pulmonar, pero presenta una especial predilección por invadir el sistema nervioso central (SNC), debido a su naturaleza neurotrópica, lo que hace que el SNC sea uno de los principales órganos diana. La meningoencefalitis criptocócica puede ser subaguda o crónica y representa la principal infección mortal de este patógeno fúngico (3)(4)(5)(6).

Los principales factores de riesgo que causan infección por *Cryptococcus* son el antecedente de infección por VIH, el uso de glucocorticoides o inmunosupresores, enfermedad autoinmune, tumor maligno, trasplante de órgano, diabetes mellitus, cirrosis hepática, falla renal crónica, enfermedad de Hodgkin y leucemia (5).

Los regímenes de tratamiento dependen del estado inmune del paciente y de la gravedad de la enfermedad, e incluyen tanto polienos como agentes antifúngicos triazólicos. Sin embargo, a pesar de la terapia antifúngica, la mortalidad sigue siendo entre 10 y 25% en pacientes con sida (4).

## **1.2. Especies de *Cryptococcus neoformans* complex**

*Cryptococcus* es un hongo de origen exógeno y cosmopolita. Existen más de 70 especies de esta levadura, de las que *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* son los agentes más frecuentes causantes de criptococosis (7). Aunque muchas de estas infecciones se producen en pacientes inmunocomprometidos, *C. gattii* ha llamado la atención debido a un brote de una enfermedad devastadora en individuos inmunocompetentes (14).

La criptococosis es una enfermedad sistémica causada por levaduras del género *Cryptococcus*, perteneciente al grupo de los basidiomicetos. La criptococosis tiene varias presentaciones clínicas, siendo las más frecuentes la infección pulmonar y la diseminación al sistema nervioso central (meningoencefalitis) (8).

### Métodos de identificación del complejo *Cryptococcus neoformans*/ *C gattii*

La identificación en el laboratorio clínico, se basa en el examen microscópico directo de la muestra y el aislamiento de la levadura. La realización de pruebas bioquímicas y detección de antígeno capsular son útiles para identificar la especie de *Cryptococcus*

En 1992, Kwon Chung y Bennett describieron un medio selectivo para diferenciar *Cryptococcus gattii* de otros *Cryptococcus* spp; el medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), el cual desde entonces ha sido utilizado ampliamente como prueba bioquímica patrón para este fin (1).

La alta especificidad del agar CGB en la diferenciación de *C. neoformans*/*C. gattii* ha sido el principal aval para que se lo reconozca como método de referencia (9).

Dicha prueba se fundamenta en la capacidad que presenta *C. gattii* de ser resistente a la L-canavanina (aminoácido natural estructuralmente similar a la L-arginina), el cual

es degradado por las cepas de esta especie y crecer en el agar CGB; sin embargo, el crecimiento de *C. neoformans* es inhibido por interferencia de la síntesis de proteínas. La resistencia de *C. gattii* se ha atribuido a la presencia de un sistema enzimático capaz de degradar la L-canavanina y convertirla en compuestos no tóxicos; de esta manera sobrevive y utiliza la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, liberando amonio lo que produce alcalinización del medio. El amonio eleva el pH, que pasa de 5,6 a 7 o más, virando el color del medio de amarillo verdoso a un azul de cobalto, por la presencia del indicador azul de bromotimol (1)(9)(10).

### **1.3. Morfología macroscópica en medios comunes**

#### Características microbiológicas

La morfología macroscópica se caracteriza por formar colonias brillantes, mucoides de color crema en término de 2 a 3 días, crece a 37 °C en los medios convencionales de diagnóstico microbiológico como el agar dextrosa de Sabouraud, pudiéndose usar también medios de cultivo habitualmente empleados para el diagnóstico bacteriológico como el agar chocolate y el agar sangre de carnero al 5 %, sin la adición de cicloheximida porque inhiben el crecimiento de las cepas de *Cryptococcus* (11)(12). La temperatura ambiental óptima para el crecimiento de la mayoría de las cepas de *C. neoformans* es de 30-35 °C, con un máximo tolerado por la mayoría de las cepas de 40 °C (3).

El complejo *C. neoformans/C. gattii* está conformado por células levaduriformes capsuladas, esféricas u ovoides y a veces de forma alargada con gemación unipolar o multipolar (11). Con las tinciones histopatológicas como la hematoxilina y eosina, las levaduras aparecen rodeadas de espacios vacíos, que reflejan la cápsula. La tinción de Gram suele revelar una levadura gram positiva poco teñida. La cápsula de polisacáridos puede identificarse mediante tinciones como la de mucicarmin y la de azul de alcian. Para la visualización de la cápsula la preparación en fresco más utilizada es la tinta china, que le confiere un contraste oscuro sobre el que se destaca

la célula con su cápsula refringente (3)(11). La cápsula se visualiza mejor en el examen directo de las muestras clínicas y puede no verse en las preparaciones en fresco hechas a partir de cultivos *in vitro*, debido a que la producción de la cápsula está inducida por factores ambientales, como pueden ser la elevada concentración de dióxido de carbono o los trastornos ferropénicos. El ambiente del huésped es ideal para la producción de la cápsula (3).

En la mayoría de las especies de *Cryptococcus* la prueba rápida de la ureasa es positiva. Las especies de *Cryptococcus*, a diferencia de las de *Candida*, poseen ureasa, una enzima que hidroliza la urea a amoníaco e incrementa el pH ambiental (3). Además, *Cryptococcus* posee una destacada actividad lacasa, una enzima que permite la conversión de los compuestos difenólicos a melanina. La detección es posible con medios que contengan, por ejemplo, semillas de alpiste (*Guizotia abyssinica*), semillas de girasol (*Helianthus annuus*), ácido cafeico, o dopamina (3)(5).

Las pruebas inmunológicas para la detección del antígeno polisacárido del criptococo en el suero y LCR son muy precisas para el diagnóstico de la enfermedad invasiva. Tanto las pruebas de aglutinación en látex como las de inmunoanálisis enzimático (ELISA) tienen una sensibilidad y una especificidad superiores al 90%. El aumento de anticuerpos con disminución de antígenos indica buen pronóstico (3).

#### **1.4. Factores de virulencia**

La patogenia de la criptococosis está determinada por tres factores: 1) el estado de las defensas del huésped, 2) la virulencia de la cepa y 3) el tamaño del inóculo. El conjunto de estas interacciones produce la manifestación final (2).

A través de la inhalación de los propágulos infectantes, el huésped susceptible entra en contacto con los criptococos ambientales. En los alvéolos, las levaduras contactan con los macrófagos alveolares, que reclutan otras células inflamatorias mediante citocinas/quimiocinas, desencadenándose una respuesta Th1 y una inflamación granulomatosa adecuada. La infección puede seguir uno de estos tres caminos: 1) En

un huésped inmunodeprimido, la levadura sigue su proliferación y diseminación, lo que provoca una enfermedad clínica; 2) La respuesta inmunitaria eficaz elimina por completo la levadura del huésped; 3) Las levaduras producen un pequeño complejo de nódulo pulmonar y adenopatía y se mantienen latentes en los tejidos, pero no se destruyen y el huésped permanece asintomático hasta que se produce la pérdida de la inmunidad local debido, por ejemplo, al tratamiento con corticoides o a una infección por HIV. En ese momento la levadura comienza a replicarse en los ganglios linfáticos pulmonares y se disemina a otros órganos (3).

#### Factores de patogenicidad

La patogénesis de la criptococosis se asocia a múltiples factores de virulencia, dado que le confieren cierta ventaja adaptativa tanto en el ambiente como en el hospedero, entre ellos se pueden nombrar estructuras polisacáridas que recubren la levadura, ciertas proteínas con actividad enzimática (fosfolipasa, proteinasa, fenoloxidasa y ureasa), la capacidad de adhesión y el tropismo por el sistema nervioso central (SNC) (5)(11)(13)(14).

Las cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* suelen crecer bien a 37 °C, lo que es fundamental para la virulencia y lo distingue de otras especies de criptococos que generalmente son intolerantes a las temperaturas corporales de los mamíferos y raramente son patógenos humanos (3).

*Cryptococcus*, a diferencia de otros hongos patógenos humanos está rodeado por una cápsula de polisacáridos que es esencial para la supervivencia, permite evadir la acción del sistema inmune de los mamíferos y es una estructura dinámica que sufre cambios en el tamaño (15). La función principal de ésta en el medio ambiente está relacionada con la supervivencia, ya que proporciona protección contra la desecación; de hecho, la adaptación de *Cryptococcus* al huésped está determinada por la inducción de la cápsula. Las cepas acapsulares de *C. neoformans* no causan enfermedad o difícilmente producen enfermedad progresiva y las cepas con una gran

cápsula dan lugar a hipervirulencia en el huésped, lo que le confiere principalmente la prevención de la fagocitosis por los macrófagos (16).

La cápsula se compone en un 90-95% de glucuronoxilomanano (GXM), 5-8% de galactoxilomanano (GalXM) y mananoproteínas (<1%) (8). El GXM está compuesto por unidades  $\alpha$ -1,3-D-manopiranososa con residuos simples de  $\beta$ -D-xilopiranosil y  $\beta$ -D glucuronopiranosil (14). El polisacárido capsular puede tener un impacto considerable sobre la inmunidad del huésped a muchos niveles fisiopatológicos; por ejemplo, actúa como barrera antifagocítica, consume complemento, interfiere con la presentación de antígeno y produce edema cerebral (2).

Una de las principales características del género *Cryptococcus* es su capacidad de sintetizar melanina, ésta incrementa ligeramente la carga negativa de las células, lo cual afecta su interacción con las células del huésped (17). La melanina es un pigmento ampliamente distribuido en la naturaleza y que es hidrofóbico e insoluble en soluciones acuosas. Existen distintos tipos de melaninas: eumelaninas, feomelanina, alomelaninas y piomelaninas. En particular, *Cryptococcus* sintetiza eumelanina a partir de compuestos difenólicos o poliaminobencenos y oxígeno (8). La melanina es producida por una enzima llamada lacasa o fenoloxidasa, mediante la polimerización de metabolitos producidos a partir de la degradación de compuestos fenólicos. *C. neoformans* y *C. gattii* poseen la lacasa, una enzima que cataliza la conversión de compuestos difenólicos, como L-DOPA, norepinefrina, epinefrina y otros compuestos aromáticos, que se autopolimerizan con rapidez para formar melanina, la cual se une a la cara interna de la membrana plasmática de la levadura. La melanina protege a la levadura por su capacidad para actuar como antioxidante. Otros mecanismos mediante los cuales protege frente al daño del huésped son: integridad de la pared celular, interferencia con la respuesta mediada por linfocitos T, inhibición de la fagocitosis mediada por anticuerpos y protección contra los cambios de temperatura y los fármacos antifúngicos (2)(14).

La urea constituye una fuente de nutrición nitrogenada utilizada por diversos microorganismos, los cuales producen una enzima (ureasa) que degrada a la urea presente en el medio (10). La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea hasta obtener amonio y carbamato. El carbamato es hidrolizado para originar ácido carbónico y una segunda molécula de amonio. A pH fisiológico, el ácido carbónico se disocia y las moléculas de amonio se unen con el agua, originando así un incremento del pH a un valor aproximado de 8 (18). Se ha descrito que la ureasa puede contribuir al paso de estas levaduras a través de la barrera hematoencefálica favoreciendo el desarrollo de criptococosis meníngea (11).

Las fosfolipasas son un grupo heterogéneo de enzimas que hidrolizan uno o más enlaces éster en los glicerofosfolípidos, cada enzima tiene la habilidad de romper una unión éster específica. La acción de esta enzima favorece la desestabilización de las membranas y lisis celular de las células del hospedero, ayudando a la diseminación del hongo (14).

La presencia de proteinasas es un factor asociado a la virulencia en una gran variedad de organismos patógenos. En aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii*, las proteinasas les confieren la capacidad de degradar colágeno, elastina, fibrinógeno, inmunoglobulinas y factores del complemento, permitiéndole al hongo generar daño en tejidos, proveerse de nutrientes y protegerse del hospedero (14).

## **1.5 Justificación**

La criptococosis es una infección que no es reportada con frecuencia a los organismos encargados del Sistema Nacional de Salud, por no estar incluida entre las enfermedades de declaración obligatoria, existiendo poca información acerca de su incidencia. La mayoría de los estudios son escasos y fraccionados.

En Paraguay se han realizado muy pocos estudios acerca de levaduras del género *Cryptococcus*, sobre todo de los factores de patogenicidad es por eso el interés de tener datos de varios centros hospitalarios.

Con este trabajo se contribuirá de manera importante a una mejor caracterización de los aislamientos pertenecientes a la colección de los más grandes Centros Hospitalarios de Paraguay y conocer algunos aspectos epidemiológicos; lo que permitirá evaluar estrategias en el manejo de los pacientes



## **1.6. Hipótesis**

Los aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans/C.gattii* poseen diferentes niveles de factores de virulencia

## 1.7. Objetivos

### Objetivos Generales

- Caracterizar fenotípicamente los aislamientos clínicos del género *Cryptococcus*.
- Determinar los factores de virulencia de los aislamientos

### Objetivos Específicos:

- Conocer aspectos epidemiológicos de los aislamientos
- Identificar y caracterizar las especies de *Cryptococcus*
- Determinar el grosor capsular y diámetro celular de las levaduras
- Medir el tiempo que demora la ureasa en evidenciar su actividad
- Evaluar cualitativamente la actividad fenoloxidasa (lacasa), fosfolipasa y proteasa

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

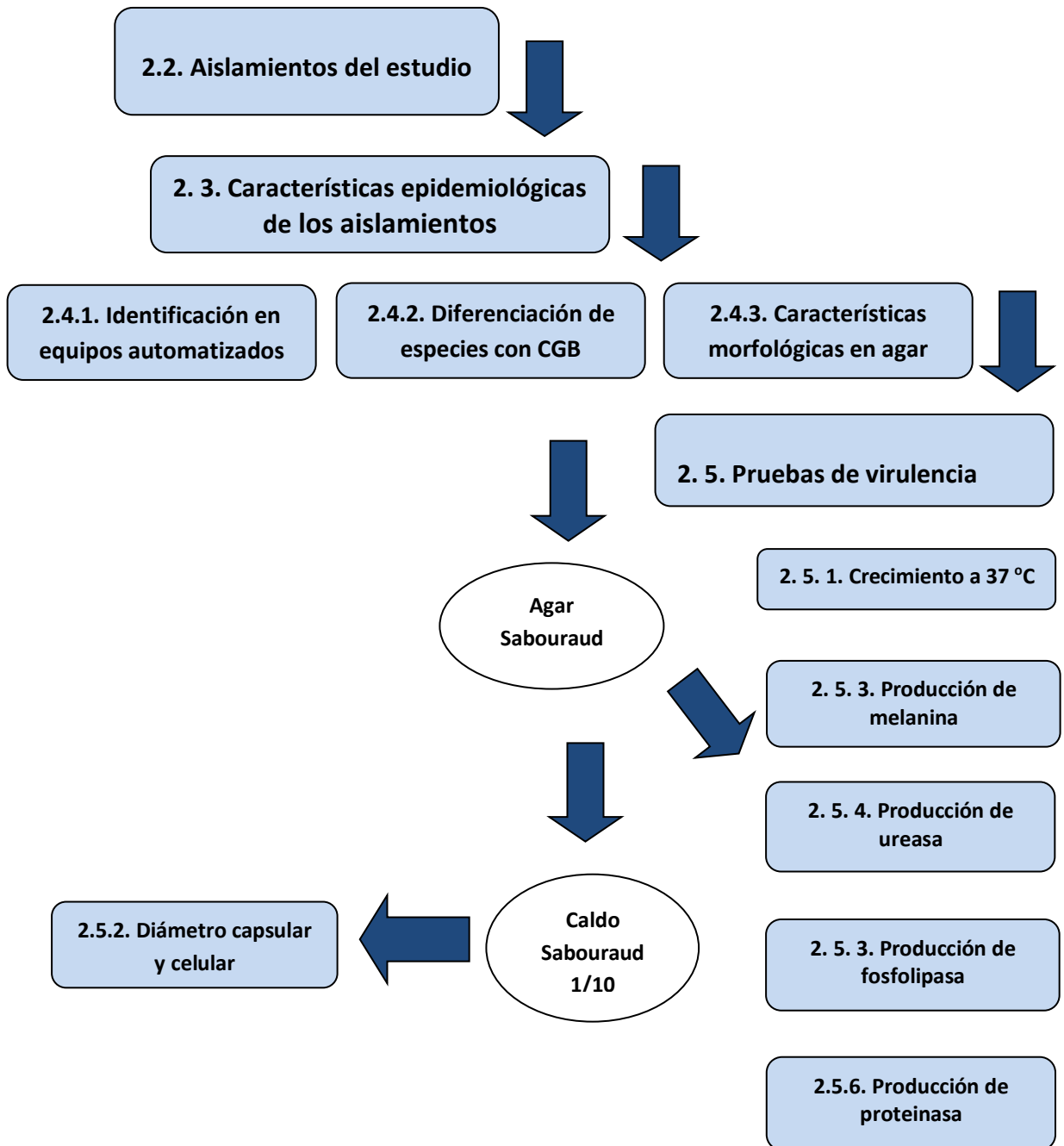
El diseño de estudio fue observacional de corte transversal con recolección retrospectiva de datos desde agosto de 2012 hasta diciembre de 2014 y prospectiva a partir de enero de 2015 hasta enero de 2016.

Criterios de inclusión:

- muestras biológicas con *Cryptococcus* spp de agosto de 2012 a enero de 2016.
- aislamientos clínicos de pacientes de todas las edades de los centros hospitalarios incluidos.

Se preparó un flujograma de trabajo para detallar el algoritmo o proceso de trabajo.

## 2.1. Flujograma de trabajo



## **2.2. Aislamientos estudiados**

Se estudiaron 60 aislamientos de *Cryptococcus* spp. de diferentes muestras biológicas. La procedencia de los aislamientos fue la siguiente: Hospital Nacional de Itaugua 35% (21), Instituto de Medicina Tropical 38,3% (23), Hospital de Clínicas 16,7% (10), Sanatorio Italiano 1,7% (1), Instituto de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente 1,7% (1) e Instituto de Previsión Social 6,6% (4). Los aislamientos fueron almacenados en viales con agua destilada estéril y conservados a 4 °C, siguiendo el método de Castellani (22).

## **2.3. Datos epidemiológicos**

Los datos epidemiológicos fueron proporcionados por los diferentes hospitales a partir de las fichas médicas de cada paciente. Se preparó una base de datos que contenía: código de identificación, material clínico, edad, género, causas predisponentes y procedencia. En la **tabla N° 1** se detallan las características epidemiológicas de los aislamientos estudiados.

**Tabla Nº 1.** Datos epidemiológicos de los 60 aislamientos estudiados del complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* provenientes de diferentes centros hospitalarios de Paraguay en el periodo de agosto 2012 hasta enero 2016.

<b>Código de identificación</b>	<b>Material</b>	<b>Edad</b>	<b>Género</b>	<b>Causas predisponentes</b>	<b>Procedencia por departamentos</b>
1	LCR	55 años	F	Vasculitis con corticoides	San Pedro
2	Hemocultivo	51 años	M	HIV (+)	Central
3	LCR	37 años	F	HIV (+)	Guairá
4	Hemocultivo	25 años	F	HIV (+)	Central
5	Liq ascítico	23 años	F	LES sin Corticoides	Caazapá
6	LCR	57 años	M	HIV (+)	Central
7	Hemocultivo	16 años	M	LES con corticoides	Central
8	LCR	56 años	M	HIV (+)	San Pedro
9	LCR	41 años	F	HIV (+)	Central
10	LCR	21 años	M	HIV (+), TB, Tabaquista	Central
11	LCR	39 años	M	HIV (+)	Central
12	LCR	46 años	M	HIV (+)	Central
13	LCR	55 años	M	Hansen con corticoides	Central
14	LCR	56 años	M	HIV (+)	Central
15	Hemocultivo	45 años	F	AR, Vasculitis, con corticoides	Caaguazú
16	LCR	59 años	M	Linfoma retroperitoneal con quimioterapia	Central
17	LCR	41 años	M	HIV (+)	Central
18	LCR	55 años	M	Etilista crónico	Cordillera
19	Hemocultivo	75 años	M	Etilista crónico, tabaquista	Central
20	LCR	36 años	F	Hansen con corticoides	Central
21	LCR	48 años	M	HIV (+)	Central
22	LCR	34 años	M	Adicto a drogas, tumor medular	Alto Paraná
23	LCR	30 años	M	HIV (+), Sífilis	Central
24	LCR	21 años	M	HIV (+)	Central
25	LCR	23 años	F	LES	Central
26	LCR	26 años	M	HIV (+)	Central
27	LCR	42 años	M	HIV (+)	Central
28	LCR	63 años	F	HIV (+)	Central
29	Hemocultivo	41 años	F	HIV (+)	Central
30	LCR	18 años	M	HIV (+)	Central

**Tabla N° 1.** Datos epidemiológicos de los 60 aislamientos estudiados del complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* provenientes de diferentes centros hospitalarios de Paraguay en el periodo de agosto 2012 hasta enero 2016 (continuación)

31	LCR	41 años	F	HIV (+)	Central
32	LCR	37 años	M	HIV (+)	Central
33	Espuito	31 años	M	Enfermedad autoinmune, HIV negativo	S Pedro
34	LCR	35 años	F	HIV (+)	Central
35	LCR	29 años	M	HIV (+)	Central
36	LCR	32 años	M	HIV (+)	Central
37	LCR	31 años	F	HIV (+)	Central
38	LCR	24 años	F	HIV (+)	Concepción
39	LCR	27 años	M	HIV (+)	Central
40	LCR	26 años	M	HIV (+)	Central
41	LCR	49 años	M	HIV (+)	Vila Hayes
42	LCR	26 años	M	HIV (+)	Central
43	LCR	21 años	F	HIV (+)	Central
44	LCR	36 años	M	HIV (+)	Central
45	LCR	34 años	M	HIV (+)	Central
46	LCR	50 años	F	HIV (+)	Central
47	LCR	34 años	F	HIV (+)	Central
48	LCR	30 años	M	HIV (+)	Central
49	LCR	31 años	M	HIV (+)	Central
50	LCR	27 años	M	HIV (+)	Central
51	LCR	34 años	F	HIV (+)	Central
52	LCR	36 años	M	HIV (+)	Central
53	LCR	34 años	F	HIV (+)	Central
54	LCR	59 años	M	HIV (+)	Amambay
55	LCR	39 años	M	HIV (+)	Central
56	LCR	s/d	M	HIV (+)	Central
57	LCR	37 años	F	HIV (+)	Central
58	LCR	45 años	M	HIV (+)	Central
59	LCR	25 años	M	HIV (+)	Central
60	Hemocultivo	37 años	M	HIV (+)	Central

**F:** femenino; **M:** masculino; **AR:** artritis reumatoidea; **LCR:** líquido cefalorraquídeo; **LES:** lupus eritematoso sistémico; **HIV (+)** paciente portador del virus de la inmunodeficiencia humana; **TB:** tuberculosis.

## **2. 4. Identificación del complejo *Cryptococcus neoformans/ C. gattii***

### **2. 4. 1. Características morfológicas en agar Sabouraud y agar papa.**

Para caracterizar la morfología de las colonias en estos medios; se sembraron los 60 aislamientos en agar Sabouraud, se incubaron 48 h. A partir de cada aislamiento se resembraron en agar papa y agar Sabouraud. Se incubaron a 37 °C por 3 días y fueron observadas la macromorfología de las colonias (forma, color, textura y borde) (12)(23) y la micromorfología (diámetro celular y grosor capsular) con tinta china. En el **protocolo N° 1** se describe la técnica.

### **2. 4. 2. Identificación en equipos automatizados**

La identificación en equipo automatizado, se utilizó el Phoenix 100 – identificación rápida *in vitro* de levaduras YEAST ID (Becton, Dickinson, EEUU) en 45 aislamientos y con Micro Scan Walk Away Rapid Yeast ID (Beckman Coulter, EEUU) en los restantes 15 aislamientos. Los detalles de la identificación en los equipos se describen **en el Protocolo N° 2**

### **2.4. 3. Diferenciación de especies con agar CGB**

La confirmación de las especies se realizó mediante el ensayo de crecimiento en agar CGB (canavanina-glicina-azul de Bromotimol). En el **protocolo N° 3** se describe la técnica.

## **2.5. Pruebas de virulencia**

### **2. 5. 1. Crecimiento a 37 °C**

Los 60 aislamientos en estudio se sembraron en medio de agar Sabouraud y se incubaron en estufa a una temperatura de 37 °C. Se observaron a las 72 horas, reportando la presencia o ausencia de crecimiento de las colonias (23).



### **2. 5. 2. Tamaño capsular y diámetro celular**

Para medir el espesor de la cápsula (distancia desde la pared celular al borde distal de la cápsula) y el diámetro celular que desarrollaron en agar Sabouraud y agar papa se suspendieron las colonias de los 60 aislamientos en 5 ml de solución fisiológica a una turbidez de 0,5 Mc Farland. Para la medición de la cápsula y el diámetro celular inducido en agar Sabouraud diluido 1/10. Se procedió según como se describe la técnica en el **protocolo N° 4**.

De la suspensión de las colonias provenientes de los medios de cultivo agar Sabouraud (Oxoid), agar papa y agar Sabouraud diluido 1/10 (Oxoid) (24), se extrajeron 20 µl de la suspensión de los 60 aislamientos para el montaje en la cámara de Neubauer y se agregó una gota de tinta china a cada una de las suspensiones. Todas las preparaciones se observaron al microscopio óptico con un aumento de 400X. Para efectuar las mediciones se tomaron fotografías con una cámara acoplada al microscopio, (SONY cyber-shot 16 mega pixeles, zoom 5), de diez campos por cada aislamiento a partir de colonias del medio agar Sabouraud 1/10.

Cada cuadro de la cámara de Neubauer de la zona de glóbulos rojos, que corresponde a 50 µm, se relacionó con los pixeles de la fotografía de las células fúngicas analizadas. Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados en Excel 2010. Las fotografías fueron procesadas en Microsoft®Paint 2010 de Microsoft Corporation.

### **2. 5. 3. Producción de fenoloxidasa en agar semilla de girasol**

Se estudió cualitativamente la actividad de esta enzima en el medio girasol según la modificación del procedimiento descrito por Franzot et al. (25) clasificándose la actividad enzimática según la intensidad de pigmentación de las colonias, en los siguientes rangos:

Nivel 0, sin actividad enzimática, color blanco

Nivel 1, actividad baja, Marrón claro;

Nivel 2, actividad media, Marrón caoba y

Nivel 3, actividad alta, Marrón oscuro (26)

La prueba se realizó por duplicado en dos lotes diferentes de agar; en caso de observarse diferencia en las tonalidades se realizó una tercera siembra. En este medio el *Cryptococcus* es capaz de sintetizar la enzima fenoloxidasa que cataliza la oxidación de sustratos hidroxibenzoicos. En el **protocolo N° 5** se describe la técnica.

#### **2. 5. 4. Producción de ureasa**

La capacidad para sintetizar ureasa se evaluó utilizando la prueba rápida de caldo urea de bioMérieux (27). Se midió el tiempo en que cambia el color del caldo de amarillo (color original) a rosado fucsia. En el **protocolo N° 6** se describe la técnica.

#### **2. 5. 5. Actividad fosfolipasa**

Para la producción de fosfolipasa se utilizó la metodología de Prince y col. basada en la siembra en placa con agar yema de huevo (SEA) donde se observa el halo de hidrólisis que produce la actividad de la enzima (20)(28). En el **protocolo N°7** se describe la técnica.

El índice de actividad enzimática (Pz) permiten tener una idea del nivel de actividad de fosfolipasa para cada aislamiento.

Los rangos de actividad enzimática de acuerdo con los valores Pz son:

Pz = 1 actividad negativa;

P z = 0,7-0,99 actividad baja;

Pz = 0,5-0,69, actividad media, y

Pz < 0,5 actividad alta (23)

## 2. 5. 6. Actividad proteinasa

La producción de proteinasas fue evaluada utilizándose el método de siembra en placa con agar caseína, donde se observa el halo de hidrólisis que produce la actividad de la enzima (29). En el **protocolo Nº 8** se describe la técnica.

El índice de actividad enzimática (Pz) permiten tener una idea del nivel de actividad de proteinasa para cada aislamiento.

Los rangos de actividad enzimática de acuerdo con los valores Pz son:

Pz = 1 actividad negativa;

Pz = 0,7-0,99 actividad baja;

Pz = 0,5-0,69, actividad media, y

Pz < 0,5 actividad alta (23)

### 3. RESULTADOS

#### 3. 1. Datos epidemiológicos

Los aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* recopilados para este estudio pertenecen a diferentes centros asistenciales, correspondiendo en su mayoría al departamento Central del Paraguay (**Figura 1**) La relación hombre/mujer fue de 2:1. La edad de los pacientes estaba entre 16 a 75 años. El 57% de los pacientes estaban entre los 26 y 45 años. Siendo la mediana de 36 años.

Se estudiaron 48 pacientes HIV(+), cuyos síntomas principales fueron: fiebre, cefalea, astenia y vómitos.

Se incluyeron además 12 pacientes HIV(-): uno con linfoma retroperitoneal, dos con lepra, una mujer con artritis reumatoide y vasculitis, un hombre con enfermedad autoinmune inespecífica, una con vasculitis, tres con lupus eritematoso sistémico, un hombre con tumor medular y dos pacientes elitistas crónicos. Todos estos pacientes presentaron en común fiebre, cefalea y vómitos.

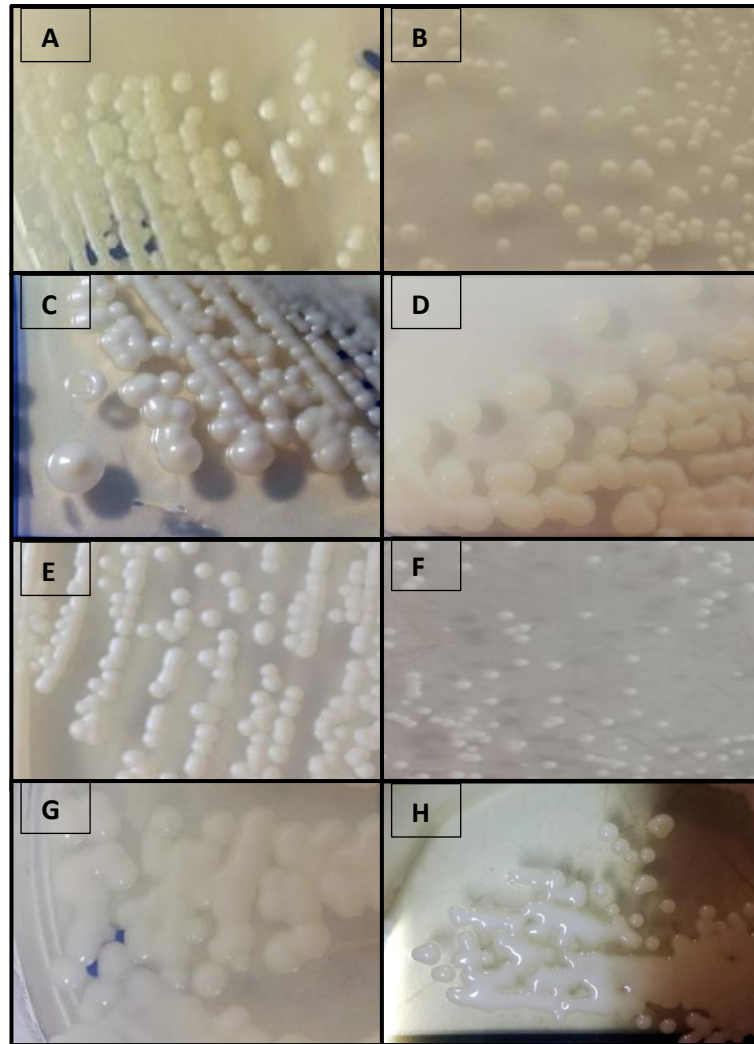


Figura 1. Mapa del Paraguay: distribución de los aislamientos con *Cryptococcus* spp.

### 3. 2. Identificación del complejo *Cryptococcus neoformans*/ *C. gattii*

La macromorfología en agar Sabouraud fue inicialmente colonias redondeadas, lisas y blancas, tornándose posteriormente a color beige. Los aislamientos con grosor capsular mayor, observadas con tinta china, presentaron una textura mucoide, y blanca brillante; por el contrario, si el grosor capsular era bajo, la morfología macroscópica mostró colonias lisas, blancas y opacas.

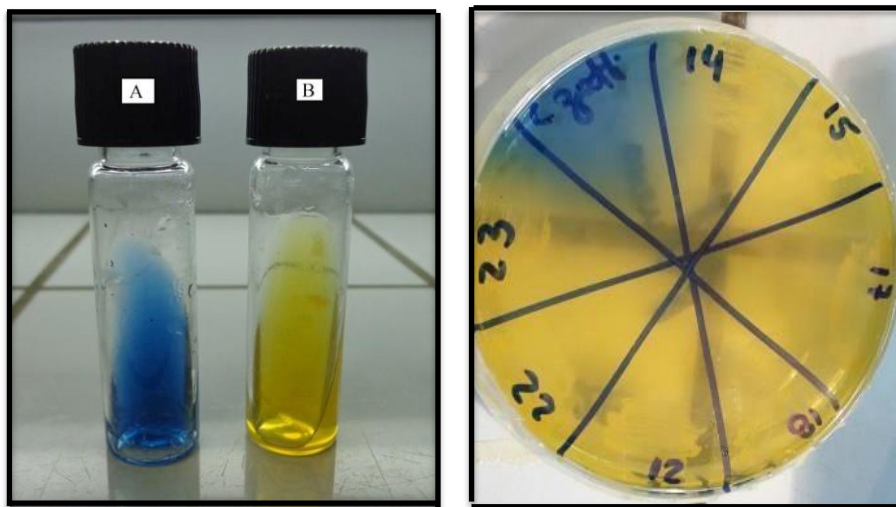
En agar papa se observó que el 47 % de los aislamientos presentaron colonias blancas brillantes, bordes no definido y textura mucoide. En contraste, este tipo de morfología solo se observó en el 18% de los aislamientos en agar Sabouraud (**Fig 2**)



**Figura 2.** Desarrollo en Sabouraud dextrosa. Colonias lisas; **A** aislamiento 34 y **B** 13. Colonias mucosas; **C** 15 y **D** 33. Desarrollo en Agar papa. Colonias lisas; **E** 54 y **F** 19. Colonias mucosas, **G** 33 y **H** 20.

Cuarenta y cinco aislamientos fueron identificados por el sistema automatizado BD Phoenix 100 – y fueron validadas como *Cryptococcus neoformans*, salvo una donde el instrumento generó un resultado de ID de *Cryptococcus neoformans* con un perfil que podría corresponder a *C. gattii* y recomendaba realizar otras pruebas para descartar a este último. Los otros quince aislamientos del estudio fueron identificados por el sistema automatizado Micro Scan Walk Away 40 Rapid Yeast ID y resultaron para *Cryptococcus neoformans*. Ningún sistema automatizado tiene en su base de datos pruebas suficientes para identificar *C. gattii*.

En la determinación de la especie con el uso del agar CGB, se encontró que, de los sesenta aislamientos ensayados, 98,3% (59/60) fueron *C. neoformans* y 1,7 % (1/60) fue *C. gattii* (**Figura 3**) y correspondía a la cepa que generó un perfil en el sistema automatizado BD Phoenix 100 que podría ser de *C. gattii*. Este fue aislado de un esputo y correspondió a un paciente agricultor de 31 años, HIV (-), con una prueba de anticuerpos antinucleares (+), la fracción C3 del complemento positivo y con radiografía y tomografía de tórax sugerente de criptococoma pulmonar.



**Figura 3. Izquierda. A** Crecimiento y liberación de amonio en agar CGB. **B** inhibición del crecimiento en agar CGB. **Derecha.** *Cryptococcus gattii* cepa control NIH B 112 del Instituto Malbran y los aislamientos con *Cryptococcus neoformans*.

### 3. 3. Pruebas de virulencia

#### Crecimiento a 37°C

Todos los aislamientos (n=60) crecieron adecuadamente a 37 °C entre 48 y 72 h en agar Sabouraud y agar papa.

#### Tamaño capsular y diámetro celular

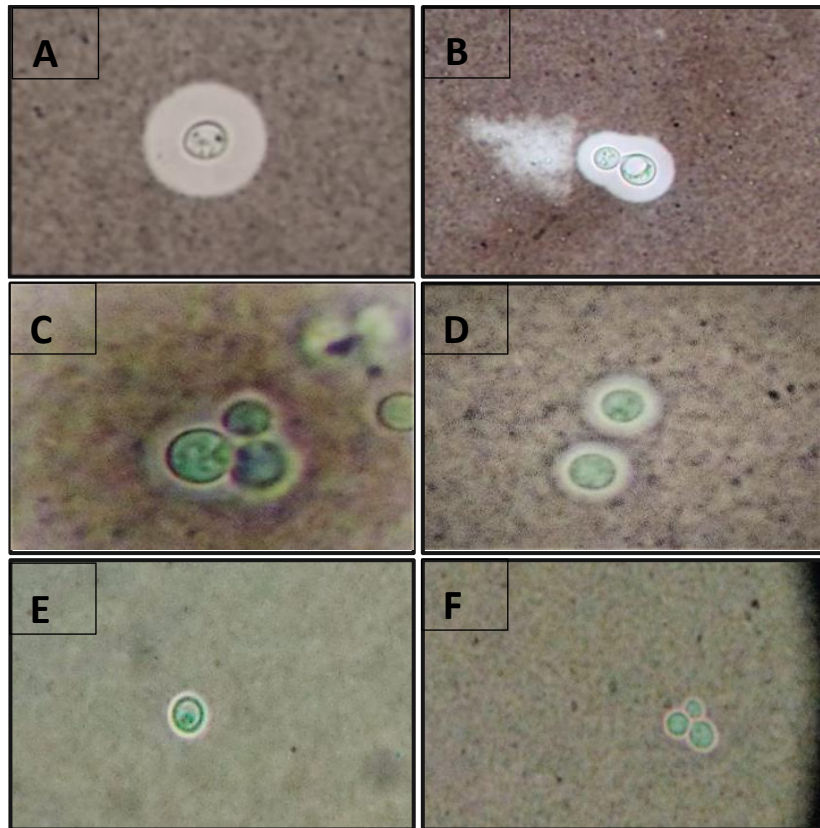
En agar Sabouraud (Oxoid) el tamaño promedio de la cápsula fue 1,43  $\mu\text{m}$  y el promedio del diámetro celular fue de 10,9  $\mu\text{m}$ .

La inducción de la capsula en medio caldo Sabouraud 1/10 (**Figura 4**) fue en un 98,3 % (59/60) de los aislamientos (solo el paciente N° 52 no aumentó el grosor de la cápsula en este medio). El aumento del grosor de la cápsula en este medio de caldo Sabouraud 1/10 fue entre 2,6 a 8,5 veces el grosor inicial en agar Sabouraud. El promedio del tamaño de la cápsula en caldo Sabouraud 1/10 de 24 h fue de 5,94  $\mu\text{m}$  (rango 2,9 a 11,1  $\mu\text{m}$ ).

El aumento de diámetro celular en caldo Sabouraud 1/10 fue entre 1,5 a 2,9 veces el diámetro inicial en agar Sabouraud. El promedio del diámetro celular en el medio de inducción fue de 21,8  $\mu\text{m}$  (rango 15,9 a 34  $\mu\text{m}$ ). **Ver Tabla 2**

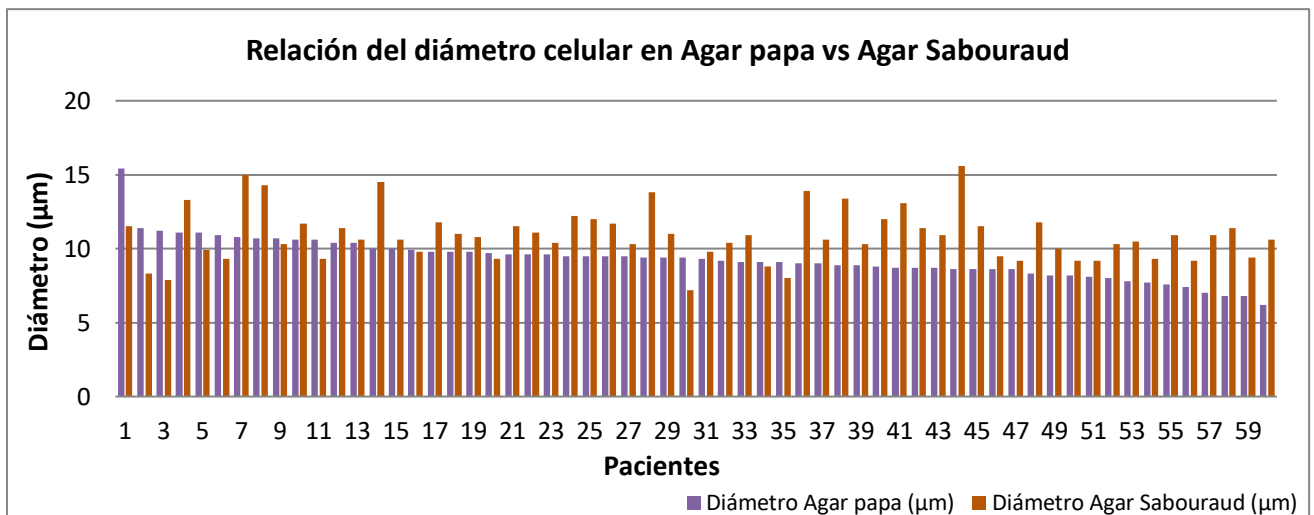
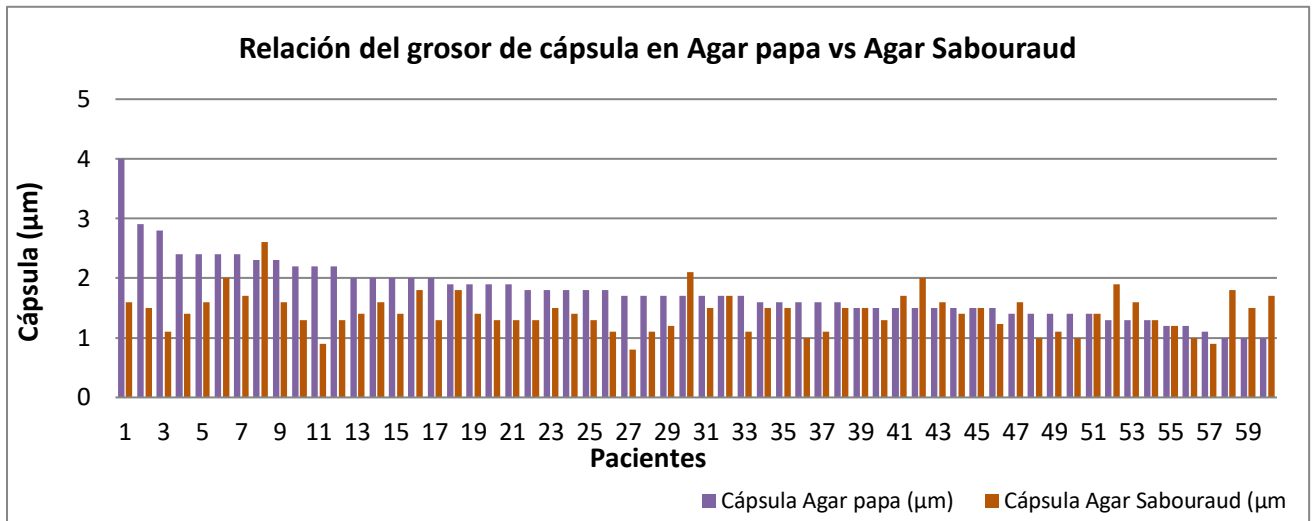
Es importante también destacar que de los 60 aislamientos se obtuvieron 40 diferentes grosores capsulares.





**Figura 4.** Inducción capsular en medio de caldo Sabouraud 1/10. **A** aislamiento 30; **B** 42; **C** 50; **D** 3; **E** y **F** 52. En los aislamientos A y B se observa buena inducción de la cápsula, en los aislamientos C y D la inducción es menor que las dos anteriores y en los aislamientos E y F no se observó inducción.

Al relacionar el tamaño de la capsula y el diámetro celular en agar Sabouraud y en agar papa. Donde el promedio del tamaño de cápsula en agar papa fue mayor con respecto al del agar Sabouraud y el promedio del diámetro celular fue mayor en agar Sabouraud que en agar papa. Se encontró diferencias, pero no estadísticamente significativas entre ambas. **(Tabla 2 y figura 5)**

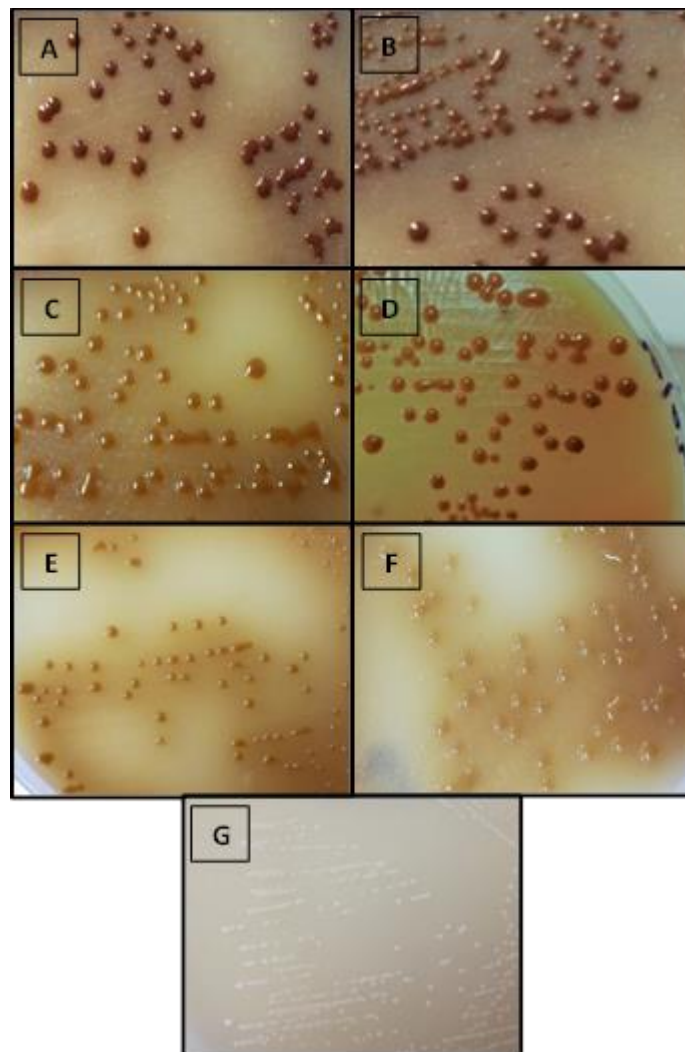


**Figura 5.** Relación entre el grosor de la cápsula y diámetro celular en agar Sabouraud y agar papa

### Producción de fenoloxidasa en agar semilla de girasol

La producción de pigmento marrón fue tomada como indicador de la producción de fenoloxidasa y fueron agrupadas atendiendo a la intensidad de éste (**Figura 6**). Todos los aislamientos presentaron actividad de la enzima fenoloxidasa. Del total de los aislamientos estudiados, 3,4% (2/60) aislamientos produjeron pigmento marrón oscuro

(nivel 3); 45% (27/60) presentaron pigmentación marrón caoba (nivel 2) y 51,6% (31/60) mostraron pigmentación marrón claro (nivel 1). Los dos aislamientos con nivel 3 de melanina eran pacientes HIV (-). Un paciente con criptococoma pulmonar (*C. gattii*) y el otro con tumor medular (*C. neoformans*) (**Tabla 2**).



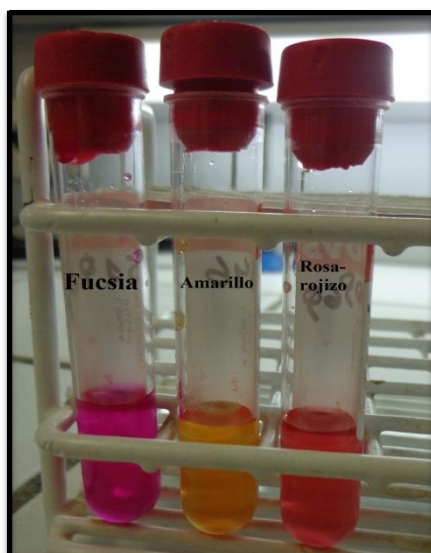
**Figura 6. Producción de fenoloxidasa en agar semilla de girasol. Nivel 3** (marrón oscuro); **A** aislamiento 33; **B** 22. **Nivel 2** (marrón caoba); **C** aislamiento 6; **D** 55; **Nivel 1** (marrón claro) **E** aislamiento 50; **F** 16. **Nivel 0:** (blanco) aislamiento **G** *Candida albicans* ATCC 60193 (control negativo).

## Producción de ureasa

Todos los aislamientos estudiados mostraron viraje del indicador del caldo de urea entre 0,5 y 3 horas a 37 °C de incubación (**Figura 7**)

El 33 % (4/12) de los pacientes HIV (-) produjeron un cambio de color del indicador del caldo urea en 30 minutos. **Tabla 2.** En cambio, el 12,5 % (6/48) de los pacientes HIV (+) en este mismo tiempo.

Es interesante resaltar que hubo una relación inversa entre el grosor de la capsula y la velocidad de producción de ureasa. Así se tuvo que de los 17 primeros grosores capsulares más bajos (2,9 a 5,1  $\mu\text{m}$ ) se encontró el 70% (7/10) de los aislamientos con 0,5 horas de viraje para la ureasa.

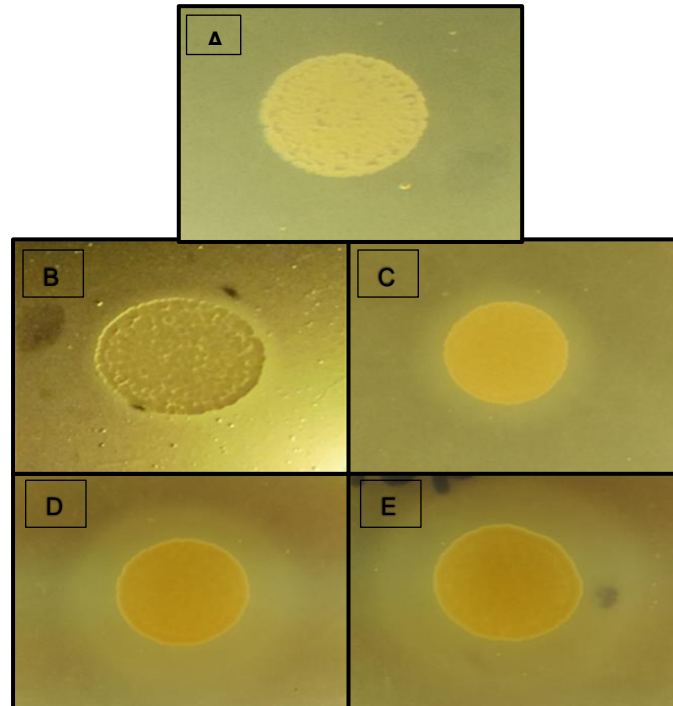


**Figura 7. Fucsia y rosado-rojizo:** hidrolisis de la urea. **Amarillo:** sin hidrolisis de la urea.

## Actividad fosfolipasa

La actividad de fosfolipasa en agar yema de huevo se evidenció a las 72 horas de incubación en estufa de 37 °C (**Figura 8**) y no sufrió variación significativa al incubar 5 días. El 38,33% (23/60) tuvo actividad media de fosfolipasa, Pz (índice de actividad

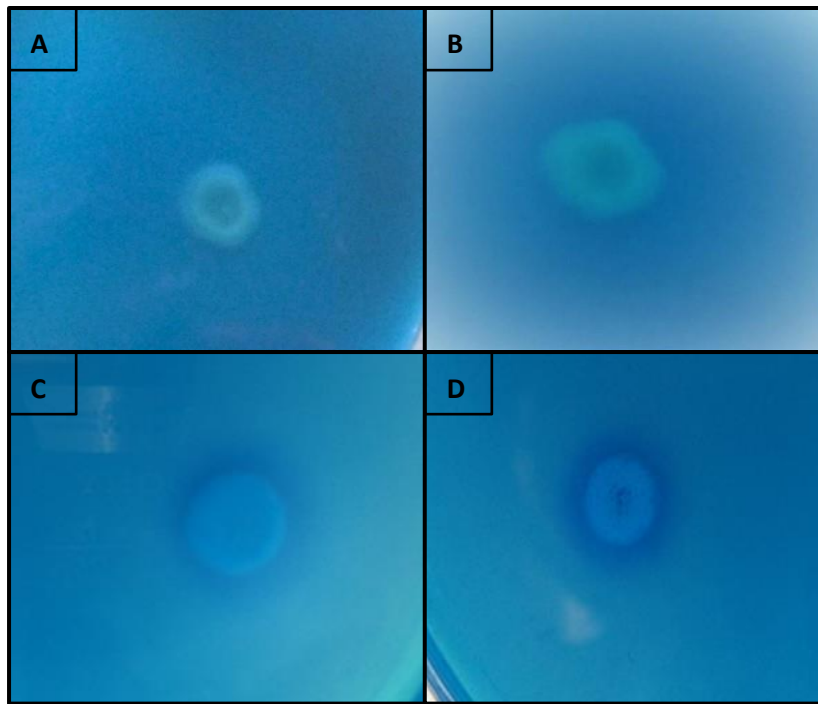
enzimática) 0,60 a 0,69. El 60% (36/60) presentó actividad baja, Pz: 0,70 a 0,86. Solo el aislamiento 51 no presentó hidrolisis.



**Figura 8.** Actividad enzimática (Pz). **Sin actividad;** **A:** aislamiento 51 (Pz 1). **Baja actividad;** **B:** aislamiento 56 (0,9) y **C:** aislamiento 16 (0,76). **Actividad media;** **D:** aislamiento 9 (0,64). y **E:** aislamiento 13 (0,6)

### **Actividad proteinasa**

La actividad de proteinasa en agar caseina se evidenció a las 72 horas de incubación a 37°C (**Figura 9**) y no sufrió variación significativa al incubar 5 días. Para una mejor visualización se reveló con ácido acético 1 N con agregado de azul de metileno. Todos los aislamientos produjeron un nivel bajo de proteinasa en un rango de Pz: 0,73 a 0,97 (actividad baja).



**Figura 9.** Actividad enzimática Pz. Baja actividad; **A:** aislamiento 3 (Pz 0,97), **B:** aislamiento 50 (0,95), **C:** aislamiento 36 (0,84) y **D:** aislamiento 34 (0,83)

**Tabla 2. Resultados de los factores de virulencia estudiados en los aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* procedentes de centros hospitalarios de Paraguay.**

N° de pacientes	Agar Sab 1/10 Cápsula (µm)	Agar Sab 1/10 Diámetro (µm)	Agar Sab Cápsula (µm)	Agar Sab Diámetro (µm)	Agar papa 72 h Cápsula (µm)	Agar papa 72 h Diámetro (µm)	Melanina Agar Girasol <sup>1</sup>	Ureasa (horas) <sup>2</sup>	Fosfolipasa (Pz) <sup>3</sup>	Proteínasa (Pz) <sup>3</sup>	Causas predisponentes
30	11,1 ± 1,6	34 ± 2,8	1,3 ± 0	11,5 ± 1	4 ± 0,7	15,4 ± 2,2	2	2,5	0,7	0,88	HIV+. Tto antirretroviral
16	8,9 ± 1,5	29,5 ± 3,6	0,9 ± 0,2	9,3 ± 0,5	2 ± 0,3	9,7 ± 0,6	1	0,5	0,76	0,73	Linfoma retroperit. Tto quimioterapia.
48	8,9 ± 1,4	27,2 ± 3,4	0,8 ± 0,2	8,3 ± 1,4	3 ± 1	11,5 ± 2,3	2	1	0,74	0,86	HIV+. Tto antirretroviral
51	8,9 ± 1,3	29,6 ± 4	1,1 ± 0,2	7,9 ± 4,4	2,4 ± 0,8	11,2 ± 1	1	1,5	1	0,91	HIV+. Tto antirretroviral
42	8,8 ± 2	29,4 ± 5,3	1,1 ± 0,3	10,3 ± 2	2,4 ± 0,4	9,5 ± 0,7	1	1,5	0,63	0,85	HIV+. Tto antirretroviral
27	8,4 ± 1,3	25,8 ± 3,2	1,5 ± 0,6	9,3 ± 0,5	1,8 ± 0,4	10,9 ± 1	1	1	0,73	0,86	HIV+. Tto antirretroviral
36	8,1 ± 2,2	30,2 ± 10,4	1,7 ± 0,2	14,5 ± 0,7	2 ± 0,4	10 ± 1	2	3	0,62	0,84	HIV+. Tto antirretroviral
8	8 ± 2,2	25,3 ± 4,5	1,4 ± 0,3	10,4 ± 1,2	1,8 ± 0,3	9,2 ± 0,7	2	1	0,61	0,9	HIV+. Tto antirretroviral
20	7,7 ± 0,78	23,3 ± 4	1,5 ± 0,08	11,7 ± 1,2	1,5 ± 0,1	9,6 ± 1,1	1	1,5	0,79	0,89	Hansen. Tto. Corticoides
15	7,5 ± 0,7	24,4 ± 2	1,4 ± 0,5	10,3 ± 0,9	2,2 ± 0,1	10,6 ± 0,6	2	3	0,79	0,82	Artritis R; Vasculitis. Tto Corticoides
29	7,4 ± 1,3	25,4 ± 2,5	1,5 ± 0,3	9,9 ± 0,5	2,9 ± 0,1	11,1 ± 0,1	1	1,5	0,65	0,86	HIV+. Tto antirretroviral
28	7,3 ± 1,8	25,5 ± 3,4	1,8 ± 0,2	9,2 ± 0,5	1,5 ± 0,1	8,3 ± 0,9	2	1,5	0,72	0,85	HIV+. Tto antirretroviral
41	7,1 ± 0,9	23,7 ± 3,2	1,3 ± 0	10,6 ± 0,6	2,3 ± 0,5	10,4 ± 0,8	2	3	0,7	0,93	HIV+. Tto antirretroviral
54	7 ± 1,7	22,5 ± 3	1,3 ± 0,5	12,2 ± 0,3	1,6 ± 0,4	9,6 ± 0,4	2	2	0,79	0,83	HIV+. Tto antirretroviral
33	6,9 ± 0,9	24,5 ± 2,3	1,6 ± 0,5	10,6 ± 1,7	2,2 ± 0,5	10 ± 1,2	3	1	0,78	0,95	Enf. autoinmune. Sin Tto Corticoides
10	6,8 ± 1,4	27,9 ± 3,4	1,3 ± 0,09	11,5 ± 0,7	1,4 ± 0,2	8,6 ± 0,7	1	1	0,82	0,9	HIV+, Tb, tabaquista. Tto antirretroviral
6	6,7 ± 1,6	22 ± 3,6	2 ± 0,08	12 ± 0,15	1,9 ± 0,54	9,5 ± 0,47	2	1	0,85	0,82	HIV+ y carcinoma. Tto antirretroviral
50	6,6 ± 1,8	22,5 ± 4,9	1,3 ± 0,3	9,4 ± 1,7	1 ± 0,2	6,8 ± 0,5	1	1,5	0,75	0,95	HIV+. Tto antirretroviral
40	6,5 ± 1,7	21,2 ± 3	1,9 ± 0	11,7 ± 0,9	2,3 ± 0,1	10,6 ± 0,2	2	3	0,72	0,86	HIV+. Tto antirretroviral
14	6,4 ± 1,6	24,3 ± 3,2	1,7 ± 0,3	15,6 ± 1	1,4 ± 0,2	8,6 ± 0,8	2	3	0,78	0,89	HIV+. Tto antirretroviral
2	6,3 ± 1,2	21,3 ± 2,4	1,6 ± 0,2	10,4 ± 1	1,5 ± 0,3	9,6 ± 0,6	1	2,5	0,84	0,86	HIV+. Tto antirretroviral
13	6,3 ± 1,6	21,2 ± 3,7	1,7 ± 0,2	11,8 ± 1	1,5 ± 0,3	9,9 ± 1,3	2	1	0,6	0,87	Hansen. Tto Corticoides
32	6,3 ± 1,4	25,9 ± 5,2	1,4 ± 0,3	12 ± 1,8	1,9 ± 0,2	8,8 ± 1,3	1	3	0,75	0,91	HIV+. Tto antirretroviral
11	6,2 ± 1,6	22,4 ± 3,4	1,6 ± 0,5	11,4 ± 1	2 ± 0,4	10,5 ± 0,8	1	0,5	0,82	0,95	HIV+. Tto antirretroviral
57	6,1 ± 1,4	20,7 ± 2,7	1 ± 0,08	9,5 ± 1,5	1,6 ± 0,3	8,6 ± 0,6	1	3	0,78	0,86	HIV+. Tto antirretroviral
3	6 ± 0,9	22 ± 2,6	2,6 ± 0,3	11 ± 0,8	1,8 ± 0,2	9,8 ± 1,1	2	3	0,84	0,97	HIV+. Tto antirretroviral
1	5,9 ± 0,8	20,1 ± 2	2,1 ± 0,2	9,8 ± 0,9	1,7 ± 0,4	9,9 ± 1	2	3	0,6	0,84	Vasculitis. Tto. Corticoides
49	5,9 ± 1	22,3 ± 2,6	1,4 ± 0,3	13,1 ± 1	1,2 ± 0,2	8,8 ± 1,2	2	1	0,62	0,9	HIV+. Tto antirretroviral
56	5,9 ± 1,5	21,2 ± 3,8	1 ± 0,3	9,2 ± 0,9	1,9 ± 0,3	9,2 ± 2	2	3	0,9	0,92	HIV+. Tto antirretroviral
18	5,8 ± 1,5	25,3 ± 3,7	1,5 ± 0,09	14,3 ± 2,4	2,3 ± 0,4	10,7 ± 1,2	1	0,5	0,68	0,81	Etilista crónico.

**1 Nivel de pigmentación a los 5 días: 1, bajo; 2, medio; 3 alto**

**2 Tiempo de cambio de color anaranjado a rosa fucsia en el caldo urea**

**3 Relación de diámetro de colonia y zona de hidrolisis**

**Tabla 2. Resultados de los factores de virulencia estudiados en los aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* procedentes de centros hospitalarios de Paraguay (continuación)**

N° de pacientes	Agar Sab 1/10 Cápsula (µm)	Agar Sab 1/10 Diámetro (µm)	Agar Sab Cápsula 72 h (µm)	Agar Sab Diámetro 72 h (µm)	Aagar papa 72 h Cápsula (µm)	Agar papa 72 h Diámetro (µm)	Melanina Agar Girasol <sup>1</sup>	Ureasa (horas) <sup>2</sup>	Fosfolipasa (Pz) <sup>3</sup>	Proteínasa (Pz) <sup>3</sup>	Causas predisponentes
5	5,6 ± 0,9	21 ± 2,7	1,5 ± 0,4	11,5 ± 1,6	1,9 ± 0,2	9,6 ± 0,6	2	3	0,71	0,92	LES. Sin uso de corticoides
23	5,6 ± 1	21,6 ± 2,6	1,4 ± 0,4	9,3 ± 1,2	2,4 ± 0,2	10,6 ± 0,6	1	1	0,63	0,91	HIV+ y Sífilis. Tto antirretroviral
37	5,6 ± 0,9	21,3 ± 3,5	1,6 ± 0,6	10 ± 0,6	1,6 ± 0,1	8,2 ± 0,5	1	3	0,68	0,89	HIV+. Tto antirretroviral
53	5,5 ± 1,7	20,6 ± 2,8	1,1 ± 0,5	9,3 ± 1,2	1,2 ± 0,2	7,8 ± 0,5	1	1	0,63	0,82	HIV+. Tto antirretroviral
55	5,5 ± 1,3	19,3 ± 2,5	1,3 ± 0,3	10,9 ± 0,9	1 ± 0,1	7 ± 0,3	2	3	0,71	0,85	HIV+. Tto antirretroviral
39	5,4 ± 0,9	20,8 ± 3,5	2 ± 0,2	10,6 ± 1,3	1,3 ± 0,2	6,2 ± 0,3	1	2,5	0,86	0,89	HIV+. Tto antirretroviral
25	5,3 ± 0,6	19,7 ± 1,8	1,5 ± 0,09	13,9 ± 2,1	1,2 ± 0,1	9 ± 1,3	1	2,5	0,73	0,73	LES. Tto. Corticoides
59	5,2 ± 0,5	21,8 ± 1,8	1,1 ± 0,05	9,8 ± 0,8	1,7 ± 0,2	9,3 ± 0,3	1	3	0,65	0,8	HIV+. Tto antirretroviral
26	5,2 ± 0,7	20,4 ± 2,3	1,3 ± 0,04	11,1 ± 0,9	1,7 ± 0,5	9,6 ± 1,2	1	1	0,7	0,79	HIV+. Tto antirretroviral
47	5,2 ± 0,9	20,2 ± 2,3	1,3 ± 0,3	10,3 ± 1,5	1,6 ± 0,2	8,9 ± 0,8	2	1,5	0,75	0,92	HIV+. Tto antirretroviral
58	5,1 ± 0,8	20,1 ± 2,1	1,2 ± 0,2	10,8 ± 1,5	1,5 ± 0,2	9,8 ± 0,1	2	3	0,65	0,85	HIV+. Tto antirretroviral
22	5,1 ± 1,7	21,1 ± 4,9	1,7 ± 0,2	8,8 ± 1,4	1,3 ± 0,1	9,1 ± 0,7	3	1	0,75	0,9	Tumor medular. Tto Radioterapia
34	5,1 ± 1,3	21 ± 2,8	1,6 ± 0,3	9,2 ± 2,1	1,5 ± 0,1	7,4 ± 0,8	1	2,5	0,61	0,83	HIV+. Tto antirretroviral
44	5,1 ± 1	23,7 ± 2,7	1 ± 0,3	10,9 ± 0,2	1,5 ± 0,1	9,2 ± 0,9	2	0,5	0,76	0,76	HIV+. Tto antirretroviral
21	5 ± 0,6	20,6 ± 2,9	1,5 ± 0,09	13,3 ± 1,4	1,5 ± 0,4	11,1 ± 1,4	1	1	0,8	0,86	HIV+. Sífilis. Tto antirretroviral
24	5 ± 0,8	19,5 ± 2,5	1,8 ± 0,09	15 ± 1,7	2,8 ± 0,3	10,8 ± 0,5	1	1	0,69	0,87	HIV+, Tto antirretroviral
45	4,9 ± 0,8	18,8 ± 2,6	1 ± 0	9,2 ± 0,8	1,4 ± 0,3	8,1 ± 0,4	2	0,5	0,69	0,85	HIV+. Tto antirretroviral
35	4,8 ± 0,9	21,9 ± 3	1,1 ± 0,09	10,9 ± 0,3	1,4 ± 0,3	7,6 ± 0,9	1	3	0,66	0,92	HIV+. Tto antirretroviral
4	4,7 ± 0,6	19 ± 2,5	1,4 ± 0,16	11,8 ± 1,3	1,7 ± 0,1	8,3 ± 1,2	1	3	0,64	0,94	HIV+. Tto antirretroviral
9	4,7 ± 0,6	21,5 ± 2,1	1,8 ± 0,2	11 ± 1	1,7 ± 0,7	9,5 ± 0,6	1	1	0,64	0,92	HIV+. Tto antirretroviral
12	4,7 ± 1	20,2 ± 2,3	1,3 ± 0,5	10,6 ± 0,5	2,1 ± 0,5	9,3 ± 2,2	2	0,5	0,63	0,93	HIV+. Tto antirretroviral
46	4,6 ± 0,7	19,2 ± 2	1,2 ± 0,6	11,4 ± 1,7	1,8 ± 0	8,7 ± 0,9	2	1	0,77	0,78	HIV+. Tto antirretroviral
43	4,5 ± 0,7	17,5 ± 1,9	1,4 ± 0,5	7,2 ± 1,4	1,9 ± 0,4	9,4 ± 0,7	1	0,5	0,83	0,92	HIV+. Tto antirretroviral
17	4,3 ± 0,5	20,2 ± 1,8	1,6 ± 0,08	10,9 ± 0,9	1,7 ± 0,2	8,6 ± 0,3	1	0,5	0,68	0,87	HIV+. Tto antirretroviral
38	4,2 ± 0,8	19,2 ± 2	1,2 ± 0,2	8 ± 1,3	1,9 ± 0,3	9,2 ± 1,1	2	2	0,78	0,83	HIV+. Tto antirretroviral
19	4 ± 0,8	18,8 ± 1,9	1,6 ± 0,4	13,4 ± 1,4	2,2 ± 0,4	8,9 ± 0,7	1	0,5	0,67	0,87	Etilista y tabaquista crónico
60	4 ± 1,1	17,5 ± 2,3	0,9 ± 0,2	10,5 ± 1,4	1,3 ± 0,1	7,8 ± 0,3	1	3	0,74	0,95	HIV+. Tto antirretroviral
7	3,9 ± 0,6	18,6 ± 1,8	1,5 ± 0,09	13,8 ± 1	2 ± 0,2	9,4 ± 1,1	2	0,5	0,66	0,93	LES. Tto con corticoides
31	2,9 ± 0,4	15,9 ± 1,7	1,1 ± 0,2	10,3 ± 0,5	1,4 ± 0,2	8 ± 0,5	2	3	0,81	0,89	HIV+. Tto antirretroviral
52	ND	ND	1,5 ± 0,2	11,4 ± 1,4	1 ± 0	6,8 ± 0,5	1	1,5	0,77	0,87	HIV+. Tto antirretroviral

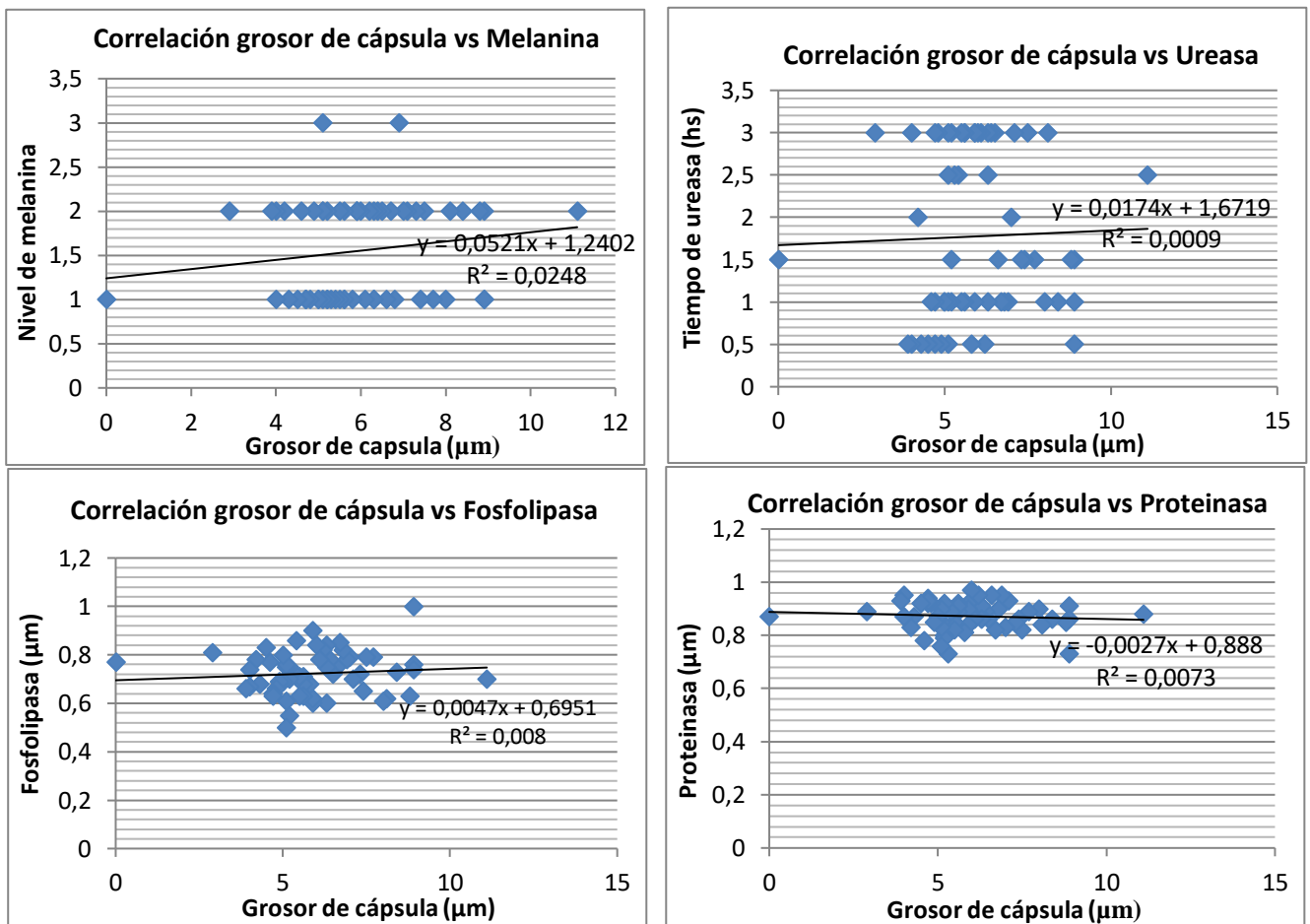
**1 Nivel de pigmentación a los 5 días: 1, bajo; 2, medio; 3 alto**

**2 Tiempo de cambio de color anaranjado a rosa fucsia en el caldo urea**

**3 Relación de diámetro de colonia y zona de hidrólisis**



La Tabla 2 está en orden descendente con respecto al grosor capsular el cual consideramos como el factor de virulencia más importante. Al comparar con los demás factores en busca de una correlación, no se observó asociación entre el tamaño capsular inducido y la producción de melanina cualitativa, la producción de ureasa, la actividad fosfolipasa extracelular, la actividad proteinasa.  $R^2: \leq 0,024$  (Figura 10).



**Figura 10.** Correlación del grosor de capsula con la melanina, la ureasa, la fosfolipasa y la proteinasa.  $r^2 \leq 0,024$



## 4. DISCUSIÓN

En Paraguay existen pocos trabajos publicados sobre el complejo *Cryptococcus neoformans/C.gattii*. Éste es el primer trabajo multicéntrico llevado a cabo sobre fenotipificación y factores de virulencia de aislamientos clínicos.

Los centros asistenciales que colaboraron para este trabajo se localizan en el departamento Central del Paraguay, por lo cual la mayoría de los pacientes pertenecen a éste.

El 83,3 % de los materiales fueron LCR, proporción similar a lo referido en otras investigaciones; por ejemplo la realizada por Fernández y col. en Cuba donde el 90% de las cepas se obtuvo a partir de muestras de LCR, lo que se corresponde con la forma clásica de presentación de la criptococosis (30).

La mediana de edad de los casos fue 36 años, similar a la mediana de edad registrada en un estudio llevado a cabo por Cattana y col. en la provincia del Chaco, Argentina, donde la misma fue de 33,5 años (31). El predominio masculino sobre el femenino, estuvo en una proporción de 2:1, valor muy próximo al observado en el mismo estudio realizado en la Argentina donde la relación descripta fue de 1,89. El sexo masculino fue el más afectado por esta micosis en pacientes HIV(+) y HIV(-), lo cual concuerda con otros estudios (31). De las 60 muestras estudiadas en este trabajo, el 80% fueron aislamientos de pacientes HIV(+); proporción que resulta superior a la evaluada en otros estudios realizados como el realizado en el Hospital Regional «Dr. Julio C. Perrando» Chaco-Argentina (31), y al estudio del Laboratorio Central de Redes y Programas de la ciudad de Corrientes donde el 69,2% de los casos analizados fueron de pacientes HIV(+) (32).

Cabe destacar la presencia de un 20% (12/60 casos) de pacientes que presentaron causas predisponentes distintas al HIV y de los cuáles el 10% (6/60 pacientes) eran tratados con corticoides debido a sus patologías de base. Los tratamientos con corticoides constituyen un factor predisponente destacado en la criptococosis en pacientes HIV(-) ya sea como única causa o acompañando a enfermedades que por sí

solas predisponen a la criptococosis (21)

El 98,3 % de los aislamientos fue de *Cryptococcus neoformans*, lo cual representa un porcentaje similar a los múltiples reportes epidemiológicos existentes, de casos de criptococosis a nivel mundial (1)(34). En un informe del Laboratorio Nacional de Referencia de Paraguay reporta 262 casos, los pacientes fueron la mayoría del departamento Central. El 97,7 % (n=256) de los pacientes fueron HIV(+) (19).

En un trabajo sobre aspectos epidemiológicos realizado por el Hospital Muñiz, se describieron 253 casos de pacientes con criptococosis diagnosticados entre 1983 y 1993. El 92% se encontraba asociado a sida, del 8 % restante las causas predisponentes fueron: linfoma, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hodgkin, trasplante renal y enfermedad autoinmune tratada con corticoides. El 87% fueron varones y el 13% mujeres (21).

Estudios de factores de virulencia son reportados escasamente en Sudamérica. Así se tiene por ejemplo el trabajo de Sanchez A. et al (20), en Colombia donde relacionan 35 aislamientos de la especie *C. neoformans* y 19 de *C. gattii*. Además, en otro estudio se de Brito C.C. et al en Belén, Brasil, se midió los factores de virulencia con 9 cepas de *C. neoformans* y 7 de *C. gattii* (33).

En este estudio se encontró 40 grosos capsulares diferentes. Esta heterogeneidad probablemente refleja una diferencia genética entre los aislamientos y la complejidad en la interacción entre los diferentes factores inductores como el CO<sub>2</sub>, el suero, el hierro, pH, y las enzimas que sintetizan la cápsula (24)(35)(36)(37).

En esta tesis se utilizó para la inducción de la capsula el caldo Sabouraud 1/10 (24) que tuvo un 98,3 % de efectividad (59/60) de los aislamientos estudiados. Este medio también ha sido utilizado en experimentos para diferenciar morfológicamente las variedades genotípicas de *C. gattii* (38).

La evolución de la criptococosis depende de la interacción entre la respuesta inmune del huésped y el potencial patógeno de cada aislamiento. Para este último, varios

factores contribuyen en el proceso de infección entre ellos el crecimiento a 37 °C, la presencia de la capsula polisacárida, la producción del pigmento melanina como antioxidante y la acción de las enzimas extracelulares ureasa, fosfolipasa, y proteinasa.

Los más notables hallazgos de este estudio son los amplios márgenes de los factores de virulencia de los 60 aislamientos. Entre ellos se destaca el grosor de la capsula con amplio rango de medidas. Se ha demostrado que un tamaño grande de la cápsula reduce la fagocitosis (39), y en consecuencia, la infección inicial puede estar favorecida en las células altamente capsuladas. Sin embargo, las partículas más pequeñas pueden diseminarse desde los pulmones y atraviesan más fácilmente la barrera hematoencefálica (40). En este sentido, un menor tamaño de cápsula puede ser ventajoso durante la diseminación y las etapas posteriores de la infección.

Además, en este trabajo se encontró que el 70% de los aislamientos con tiempo de ureasa positiva a los 30 minutos tuvieron una cápsula inducida dentro del grupo de los de menor grosor, esto se relaciona con los trabajos de Shi y col, donde demuestran que una capsula pequeña y la producción de ureasa son factores que favorecen el mejor traspaso de la barrera hematoencefálica (41); por tanto una mejor diseminación. La ureasa aumenta el número de sitios de transmigración en el cerebro, dando como resultado un mayor recuento en este órgano y una supervivencia reducida en el huésped.

Según Rivera y col. (42), el grosor de la cápsula es órgano específico. Entonces, es posible que las discrepancias observadas entre la virulencia y la expresión del tamaño de la cápsula y los demás factores como la fosfolipasa, la melanina y la proteinasa dependan de la etapa de la infección y el órgano ocupado en ese momento por el hongo.

En cierto grado, la cápsula y la producción de melanina parecen ser necesarios para la supervivencia en el huésped, pero no hay una relación en el grado de expresión y el grado de virulencia en modelos animales (43)(44).

En este trabajo no se encontró correlación del tamaño de la capsula y los demás factores de virulencia, siendo muy probable que la virulencia dependa de la expresión o producción coordinada de estos factores en la gravedad o no de la infección (45)(46).

Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales en modelos *in vivo* para determinar con certeza estas conclusiones relacionados a los factores de virulencia aquí hallados.

## 5. CONCLUSIONES

- Los aislamientos pertenecieron a pacientes con una relación hombre/mujer 2:1; que correspondían en su mayoría al departamento Central y su factor predisponente era la infección por HIV
- Todos los aislamientos correspondieron a la especie *Cryptococcus neoformans*, excepto uno que fue *C. gattii*.
- El medio de inducción capsular (caldo Sabouraud 1/10), fue muy efectivo al inducir el tamaño de la cápsula a 98,3% de los aislamientos.
- Poco más del 50% de los aislamientos produjo fenoloxidasa con un nivel 1 de pigmentación.
- La actividad ureasa estuvo presente en todos los aislamientos y su positividad pudo visualizarse a las 3 h en la mayoría de los casos (32%).
- El 60% de los casos analizados presentó una actividad baja de fosfolipasa.
- Todos los aislamientos presentaron baja actividad de proteinasa.
- No se observó diferencias estadísticamente significativas en los valores obtenidos para los factores de virulencia analizados entre los pacientes HIV(+) y HIV(-)
- No se observó correlación entre los valores de grosor de la capsula inducida y los valores obtenidos para los demás factores de virulencia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Pérez C, Hernández Y, Colella MT et al. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* mediante el uso del medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Rev la Soc Venez Microbiol. 2003;23(2):158–62.
2. Arredondo C. *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas recolectadas en lugares públicos de la ciudad de Santiago, Chile. Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología; 2006.
3. Mandell G, Bennette JDR. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. séptima ed. ELSEVIER, editor. Barcelona; 2015. 3281-95 p.
4. Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. Proc Am Thorac Soc. 2010;7(3):186–96.
5. Arenas R. Criptococosis. In: McGraw-Hill Interamericana Editores SA de CV, editor. Micología médica ilustrada. 4a. Mexico D.F.; 2011. p. 242–9.
6. Del Poeta M Casadavall A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. Mycopathologia 2012;173(5–6):303–10.
7. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th Edition. The Yeasts. 2011. 2384 p.
8. Garcia R. Papel de los cambios morfológicos en la virulencia de *Cryptococcus neoformans*. Universidad Complutense de Madrid; 2014.
9. Martínez G, Barrial Lllnait M et al. Utilidad de la D-prolina en la diferenciación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*. REV Cuba MED TROP. 2004;56(2):77–9.
10. Baró T. Epidemiología de la Criptococosis en España. Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona; 2002.
11. Casillas N. Fenotipificación y Genotipificación del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* en aislamientos clínicos del Noreste de Mexico. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2012.
12. Bava A, Zuliani M. Desarrollo de *Cryptococcus neoformans* en medios de cultivo empleados para diagnóstico bacteriológico. Acta bioquím clín latinoam. 2009;43(2):195–9.
13. Echeverría A, Durante A, Arechavala A, Negroni R. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol. 2002;19:95–8.
14. Torres G. Estudio de características genotípicas y fenotípicas entre aislamientos colombianos de *Cryptococcus gattii* serotipo B – patrón VGII, procedentes de Cúcuta y aislamientos responsables de la epidemia en Vancouver, Canadá. Universidad Nacional e Colombia; 2010.



15. McFadden D, Zaragoza O, Casadevall A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol. 2006;14(11):497–505.
16. Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E, Kenno S, Perito S, Cenci E, et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. Future Microbiol. 2013;8(9):1107–16.
17. Urán ME, Cano LE. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. Infectio. 2008;12(2):128–48.
18. Perez C, Goitia K et al. Utilización del caldo de urea de Stuart para el test de la ureasa, como prueba en el diagnóstico de las levaduras. Rev Soc Ven Microbiol. 2002;22(2):137–40.
19. Aguilar G., Araujo P., Arce N., Martínez M. Riera E. Micosis en Paraguay: Informe de casos en Laboratorio Nacional de Salud Pública (1993-2013). Rev del Congr Paraguayo Infectología. 2013;
20. Sanchez A, Escandon P, Castaneda E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. Rev Iberoam Micol. 2008;25(3):145–9.
21. Bava AJ, Robles AM, Negroni R, Arechavala A, Bianchi M. Estudio de algunos aspectos epidemiológicos de 253 casos de criptococosis. Rev Iberoam Micol. 1997;14:111–4.
22. Pérez C\*, Mata-Essayag S\*, Hartung de Capriles C\*, Roselló A\*, Colella MT\*, Olaizola C\* LM. Mantenimiento de *Cryptococcus sp.* con el método de Castellani. Rev Soc Ven Microbiol. Caracas; 2003;23(2).
23. Huérfano S, Cepero M, Castañeda E. Caracterización fenotípica de aislamientos ambientales de *Cryptococcus neoformans*. Biomédica núm 3. 2003;23(3):328–40.
24. Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. Biol Proced Online. 2004;6(1):10–5.
25. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. grubii: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol. 1999;37(3):838–40.
26. Tello M, Gutiérrez E, Béjar V, Carlos Galarza, Ramos W O-LA. Criptococosis. Rev Médica Risaralda. 2013;19(2):147–53.
27. Zimmer BL, Roberts GD. Rapid selective urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1979;10(3):380–1.
28. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982. p. 7–14.
29. Ombrella AM, Racca L, Ramos L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con

- distintos valores de pH. Rev Iberoam Micol. 2008;25(1):12–6.
30. Fernández C, Martínez G, Illnait M, Perurena M, Gonzalez M. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en aislamientos clínicos cubanos. Rev Cuba Med Trop. 1998;50(2):167–9.
  31. Cattana ME, Tracogna MF, Fernández MS, Carol M, MC, Sosa MA, Giusiano GE. Genotipificación de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* obtenidos en el Hospital «Dr. Julio C. Ferrando», de la ciudad de Resistencia (Chaco, Argentina). Rev Argent Microbiol. 2013;45(2):89–92.
  32. Cattana ME, Fernandez MS, Rojas F et al. Genotipos y epidemiología de aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans* en Corrientes, Argentina. Rev Ar Microbiol. 2015;47(1):82–3.
  33. Brito CC, Silveira F, Marques S. Producción de factores de virulencia in vitro en aislamientos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origen clínico en Belén, Estado do Pará, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude 2012; 3(2):59-65
  34. Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3669–72.
  35. Granger DL, Perfect JR, Durack DT. Virulence of *Cryptococcus neoformans*: Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. J Clin Invest. 1985;76(2):508–16.
  36. Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. Microbiology. 2001;147:2355–65.
  37. Zaragoza O, Fries BC, Casadevall A. Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO<sub>2</sub>. Infect Immun. 2003;71(11):6155–64.
  38. Fernandes K, Dwyer C, Campbell L, Carter D. Species in the *Cryptococcus gattii* Complex Differ in Capsule and Cell Size following Growth under Capsule-Inducing Conditions. mSphere. 2016;1(6).
  39. Syme RM, Bruno TF, Kozel TR, Mody CH. The capsule of *Cryptococcus neoformans* reduces T-lymphocyte proliferation by reducing phagocytosis, which can be restored with anticapsular antibody. Infect Immun. 1999;67(9):4620–7.
  40. Long M, Huang SH, Wu CH, Shackelford GM, Jong A. Lipid raft/caveolae signaling is required for *Cryptococcus neoformans* invasion into human brain microvascular endothelial cells. J Biomed Sci. 2012;19.
  41. Shi M, Li SS, Zheng C, Jones GJ, Kim KS, Zhou H, et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. J Clin Invest. 2010;120(5):1683–93.
  42. Rivera J, Feldmesser M, Cammer M, Casadevall A. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. Infect Immun. 1998;66(10):5027–30.

43. Mc Clelland EE, Perrine WT, Potts WK, Casadevall A. Relationship of virulence factor expression to evolved virulence in mouse-passaged *Cryptococcus neoformans* lines. *Infect Immun.* 2005;73(10):7047–50.
44. O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. *Clinical Microbiology Reviews.* 2012. p. 387–408.
45. Kozel TR. Virulence Factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 1995;3(8):295–9.
46. Blackstock R, Buchanan K, Cherniak R, Mitchell T, Wong B, Bartiss A, et al. Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* is Associated with Quantitative Differences in Multiple Virulence Factors. *Mycopathologia* 1999 p. 1–11.
47. Negroni R, Guelfand L, Perrone MC. Manual de medios y reactivos del laboratorio de micología- red de micología GCBA). Buenos Aires; 2011. Report No.: 2.
48. Koneman E, Allen S JW. Protocolos. In: Panamericana, editor. Diagnóstico Microbiológico. Quinta edi. Buenos Aires; 1999. p. Protocolo 72; 1350.
49. Vidotto V, Melhem M, Pukinskas S, Aoki S, Carrara C, Pugliese A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2005;22(1):29–33.

## **ANEXOS**

### **Protocolo N° 1**

**Tinta china:** El hongo puede ser observado en preparaciones en fresco mediante montaje con tinta china diluida. Es útil para observar la presencia de la cápsula de *Cryptococcus* spp. basada en la coloración negativa (47)(26). El colorante se emplea en una dilución 1:2 con agua destilada (5).

Se hace una suspensión 0,5 Mc Farland de las colonias de cada placa de agar Sabouraud y agar papa. Para visualizar se coloca una gota del producto biológico por examinar en un portaobjetos con una gota de tinta china y se coloca el cubreobjetos, para observar al microscopio.

La cápsula repele las partículas de carbón de la Tinta china dando un halo claro que corresponde a la cápsula, que está bien demarcada alrededor de cada célula levaduriforme. La levadura aparece sobre un fondo oscuro envuelta en una zona no teñida que es la cápsula (10)(26)(47).

### **Protocolo N° 2**

**Identificación con equipo automatizado:** A partir de un cultivo de 48 horas de crecimiento a 37 °C en agar Sabouraud dextrosa, se procedió a preparar un inóculo de cada cepa procediendo según las instrucciones del equipo. Las lecturas con los equipos automatizados Phoenix 100 y MicroScan Walk Away 40 se realizaron a las 24 horas.

### **Protocolo N° 3**

**Identificación con agar CGB (agar Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol):** A partir de un cultivo de 48 horas de crecimiento a 37 °C en agar Sabouraud sin antibióticos, se procedió a realizar la siembra en la superficie del bisel de los tubos. Se

incubaron en estufa a temperatura de 28 °C y se observaron diariamente hasta un máximo de 5 días.

Interpretación de los resultados:

Color amarillo o amarillo-verdoso = Negativo

Color azul de cobalto = Positivo

Para la preparación del agar CGB se utilizó.

**Solución A (Suplemento):** Glicina 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 1 g, Tiamina HCl 1 mg, L-canavanina 30 mg, Agua destilada 100 ml. Ajustar el pH a 5,6. Esterilizar por filtración.

**Solución B:** Azul de bromotimol sódico 0,2 g. Agua destilada 50 ml.

**Base:** Mezclar 440 ml de agua destilada, 10 ml de **Solución B** y 10 g de agar.

Autoclavar 15 minutos a 1 atm. Para preparar el medio mezclar una parte del **Suplemento** con 9 partes de la **Base** fundida y enfriada a 45° C. Envasar en tubos de hemólisis estériles en pico de flauta (1)

Cepas controles:

*C. neoformans* W10 A (Instituto Malbran). Color amarillo

*C. gattii* NIH B 112 (Instituto Malbran). Color azul cobalto

#### **Protocolo. Nº 4**

##### **Inducción de la cápsula en caldo Sabouraud diluido 1/10 (Oxoid)**

Para la inducción de la cápsula se cultivaron los 60 aislamientos en agar Sabouraud y se incubaron a 37 °C por 6 horas, luego se resembraron dos veces más cada aislamiento cada uno por 6 horas. A partir de éstos se suspendieron en solución fisiológica a una turbidez del 0,5 Mc Farland. Se lavaron dos veces con solución fisiológica. Se agregó 5 ml de Sabouraud diluido 1/10 (diluido en solución fisiológica) al sedimento y se incubaron a 37 °C por 24 horas sin agitación.

## Protocolo Nº 5

### Determinación de Fenoloxidasa

A partir de cultivos puros sembrados en agar Sabouraud dextrosa durante 48 h a 37 °C, se tomaron colonias aisladas y se inocularon en solución fisiológica a una turbidez de 0,5 Mc Farland; cada uno de los 60 aislamientos. Se sembraron en agar semilla de girasol (glucosa 1 g, creatina 0,78 g, agar 18 g, cloranfenicol 0,05 g, extracto de semilla de girasol 350 ml) durante 5 días a 28 °C porque la actividad de la enzima parece ser inhibida a temperaturas cercanas a los 37 °C.

Cuando crecen en medios que contienen compuestos difenólicos como el agar semilla de girasol (*Helianthus annuus*) las colonias son de color marrón al cabo de 1 a 5 días dependiendo del aislamiento. Esto se debe a la producción por parte de la levadura de una enzima la fenoloxidasa, que convierte los sustratos hidroxibenzoicos en pigmentos marrones que imparten el color oscuro a las colonias y al medio. Esta reacción enzimática da como producto final melanina, la cual es absorbida por la pared del hongo dando un color pardo (10). Se utilizaron controles para comparar con las siembras de todos los aislamientos.

Cepas controles:

Control positivo: *C gattii* NIH B 112 (Instituto Malbran). **Nivel 2** (marrón caoba)

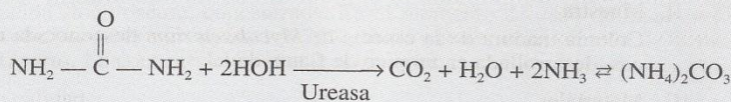
Control negativo: *Candida albicans* ATCC 60193. **Nivel 0** (blanco)

## Protocolo Nº 6

### Determinación de la Ureasa

Se utilizó el medio líquido que contiene urea 20 g/l, L-triptófano 3 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l, Cloruro sódico 5 g/l, Etanol al 95% 10 ml y rojo de fenol 0,05 g/l como indicador de pH.

La urea es una diamida que es hidrolizada por la ureasa, con la consiguiente liberación de amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, lo que produce alcalinización y aumento de pH del medio (48).



Utilizando un cultivo de 24 horas de crecimiento en Sabouraud a 37 °C, se arrastró suficiente cantidad de colonias y se inoculó en 2 ml del medio urea, ajustando la turbidez al 1 de Mac Farland. El tubo se incubó en estufa a 37 °C (18).

La conversión de urea a amonio después de 0,5 y 3 horas de incubación, incrementa el pH y produce un cambio de color de amarillo (color inicial), pasando por anaranjado, rosado-rojizo y finalmente a fucsia.

Interpretación de resultados

Color anaranjado, rosado-rojizo o fucsia: Hidrólisis de la urea.

Color amarillo: Ausencia de hidrólisis de la urea.

Cepas controles

Control positivo: *C neoformans* W10 A (Instituto Malbran). Fucsia

Control negativo: *Candida albicans* ATCC 60193. Amarillo

## Protocolo Nº 7

### Determinación de Fosfolipasa

Todos los aislamientos fueron sembrados en medio de Sabouraud sin adición de antibióticos e incubadas a 37 °C durante 48 h. A partir de estas siembras se prepararon los inóculos de trabajo en solución fisiológica estéril. El inóculo final fue aquél que correspondió a una turbidez de 0,10 UTN (unidad nefelométrica) utilizando el nefelómetro de BD Phoenix Spec™ equivalente a una densidad óptica entre 0,073 y 0,082 de absorbancia a una longitud de onda de 630 nm, medido con el lector de microplacas Rayto RT-2100C.

Se empleó pipeta automática y cada aislamiento se sembró por triplicado 5 µl de las soluciones de trabajo en agar Sabouraud yema de huevo -SEA-

Preparación de agar SEA: Agar glucosado de Sabouraud 65 g; NaCl 58,45 g; CaCl<sub>2</sub> 0,0554 g; yema de huevo estéril 80 ml; agua destilada 1000 ml, de acuerdo con Price et al (13).

El ensayo fue realizado a partir de la incubación de las placas a 37 °C, siendo la lectura realizada a las 72 h y a los 5 días a la totalidad de los ensayados. La formación de una zona opaca alrededor de las colonias indica precipitación por producción de fosfolipasa. Empleando una regla calibrada se midieron los diámetros de las colonias, así como los diámetros de zonas de hidrólisis y se calcularon los índices de actividad enzimática (Pz) como la relación entre estos valores. El diámetro de la colonia es (*a*) y el diámetro de colonia más la zona clara (*b*) la relación  $Pz = a/b$ . El valor Pz de tres inóculos diferentes de cada cepa se midió para obtener el valor promedio. Luego se hizo un promedio de los tres valores obtenidos de cada cepa a las 72 h y a los 5 días de incubación. El índice de actividad enzimática puede tomar valores que van de 0 a 1, correspondiendo aquellos más próximos a 0 a niveles máximos de actividad enzimática. Inversamente, aquellos índices con valores próximos 1 son indicativos de un bajo nivel en dicha actividad. Aislamientos que no presentan actividad fosfolipasa el índice Pz es igual a 1 (13)(49).

Cepas controles utilizadas:

*C. neoformans* W10 A (Instituto Malbran): 0,73 (actividad baja)

*C. gattii* NIH 112 B (Instituto Malbran): 0,69 (actividad media)

## **Protocolo Nº 8**

### **Determinación de proteasas**

Al igual que para la determinación de fosfolipasa los aislamientos fueron sembrados en medio de Sabouraud sin antibiótico e incubadas a 37 °C durante 48 hs. A partir de estas siembras se prepararon los inóculos de trabajo en solución fisiológica estéril. El inóculo final fue aquél que correspondió a una turbidez de 0,10 UTN utilizando el Nefelómetro de BD Phoenix Spec™ equivalente a una densidad óptica entre 0,073 y



0,082 de absorbancia a una longitud de onda de 630 nm, medido con el lector de microplacas Rayto RT-2100C.

Se empleó pipeta automática y cada aislamiento se sembró por triplicado, 5 ul de las soluciones de trabajo en agar caseína.

Preparación de agar caseína: Peptona de carne 5,0 g, Extracto de carne 3,0 g, NaCl 5,0 g; Caseína 2,5 g; Ca Cl<sub>2</sub> 0,05 g; Agar-agar 13,5 g; Agua destilada 1,0 L; leche descremada 10%.

El diámetro de la colonia es (*a*) y el diámetro de colonia más la zona clara que corresponde a la hidrólisis de las proteínas del medio (*b*). Así como la actividad fosfolipasa, la relación  $Pz = a/b$  de cada muestra también es calculada para la actividad proteasa. El valor Pz de tres diferentes inóculos de cada cepa se midió para obtener el valor promedio. Este índice permite tener una idea del nivel de actividad de proteinasa para cada aislamiento. El mismo puede tomar valores que van de 0 a 1, correspondiendo aquellos más próximos a 0 a niveles máximos de actividad enzimática. Inversamente, aquellos índices con valores próximos 1 son indicativos de un bajo nivel en dicha actividad. Cepas que no presentan actividad fosfolipasa el índice Pz es igual a 1 (20).

Cepas controles utilizadas:

*C. neoformans* W10 A (Instituto Malbran): 0,75 (actividad baja)

*C. gattii* NIH 112 B (Instituto Malbran). 0,80 (actividad baja)