

**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD  
ANTIFÚNGICA Y CARIOTIPO DE *Cryptococcus*  
*neoformans*, AISLADOS DE MUESTRAS CLÍNICAS EN  
VENEZUELA.**

**EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY AND  
KARYOTYPE OF *Cryptococcus neoformans* ISOLATED FROM  
CLINICAL SAMPLES IN VENEZUELA.**

Calvo, B.<sup>1</sup>; Colombo, A.<sup>2</sup>; Fischman, O.<sup>2</sup>; Santiago, A.<sup>3</sup>; Nunes, F.<sup>2</sup>;  
Branchini, M.L.<sup>4</sup>

1. La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela,
2. Universidade Federal de Sao Paulo, Escola Paulista de Medicina. Sao Paulo, Brasil.
3. Hospital Clínico. Caracas, Venezuela,
4. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil.

**RESUMEN**

Para evaluar la susceptibilidad a los antimicóticos y el cariotipo de aislados clínicos de *Cryptococcus neoformans* obtenidos en Venezuela, fueron estudiadas 30 muestras, procedentes de 27 pacientes con y sin infección por VIH. A cada una se le hizo identificación por métodos clásicos, estudio de la variedad a través del medio CGB, serotipificación por aglutinación con 5 antisueros, pruebas de susceptibilidad a anfotericina B, fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina, según la metodología del NCCLS y estudio del cariotipo por electroforesis de campo pulsado usando el sistema "contour-clamped homogeneous field gel electrophoresis" (CHEF). Se obtuvieron 27 aislados de *C. neoformans* var. *neoformans*, siendo todos serotipo A, y 3 *C. neoformans* var. *gattii*, perteneciendo 2 al serotipo B y 1 al serotipo C. Las cepas de esta serie fueron altamente susceptibles a las drogas estudiadas. El análisis del cariotipo mostró 13 perfiles, que presentaron entre 7 y 9 cromosomas y variación de peso molecular de 450/565 y 2200 kb. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones inhibitorias mínimas, ni fue posible asociar perfiles de

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

cariotipo de las muestras según la presencia o ausencia de infección por VIH. Se necesita un mayor número de cepas de diferentes áreas geográficas para la mejor caracterización de *C. neoformans* en Venezuela.

**Palabras claves:** Susceptibilidad, cariotipo, *Cryptococcus neoformans*, Venezuela.

### ABSTRACT

Thirty (30) samples coming from 27 HIV infected and non-infected patients were studied to assess antimicrobial susceptibility and karyotype of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates obtained in Venezuela. Identification of each sample was performed by standard methods, variety classification was based on growth in CGB agar medium, serotyping was performed by slide agglutination with five specific sera. Antifungal susceptibility was performed for amphotericin B, fluconazole, itraconazole and 5-flucytosine, according to NCCLS recommendations and karyotype study was done through contour clamped homogenous field gel electrophoresis (CHEF).

Twenty seven (27) isolates of *C. neoformans* var. *neoformans* were obtained, all being of serotype A, and three (3) isolates of *C. neoformans* var. *gattii*, two (2) belonging to serotype B and one (1) to serotype C. Strains of this series were highly susceptible to the antifungal agents tested. Electrophoretic Karyotype (EK) analysis showed 13 profiles, presenting between 7 and 9 chromosomes and the molecular weight variation was 450/565 and 2200 kb. No significant differences were observed between the minimum inhibitory concentrations (MIC), nor was it possible to associate EK profiles among the isolates of HIV and non HIV patients. Further clinical and laboratorial investigations are mandatory to improve the understanding of *C. neoformans* in Venezuela.

**Key words:** Susceptibility, karyotype, *Cryptococcus neoformans*, Venezuela.

### INTRODUCCIÓN

*Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* es reportado en la mayoría de los países mientras que *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii* prevalece en regiones tropicales y subtropicales [31,36,38,43,44,65](#). En pacientes con síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), los aislados de *C. neoformans* var.

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

*neoformans* han predominado, aun en investigaciones realizadas en áreas geográficas donde *C. neoformans* variedad *gaini* es frecuente. [8,10,39,52,55](#)

Varios sistemas de tipaje molecular han sido aplicados al estudio de la epidemiología de *C. neoformans*, en forma aislada o combinada [6,11,15,49,64](#). Entre las técnicas más usadas se destaca la electroforesis de campo pulsado (PFGE). Con el uso de "contour-clamped homogeneous gel field electrophoresis" (CHEF), un sistema de PFGE, Perfect et al. [49](#) refirieron que el tamaño de los cromosomas de *C. neoformans* era similar al de los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. Algunos autores estiman que una reorganización cromosomal ocurre durante la infección en tejidos humanos [33](#). Perfect et al. [48](#) investigaron el perfil del cariotipo de *C. neoformans* var. *neofarmans* en la epidemiología de las infecciones por *C. neoformans* de pacientes con y sin infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). El sistema CHEF fue el utilizado para el análisis del cariotipo. No se verificó un perfil asociado a la localización de la infección, área geográfica o presencia de infección por VIH. Fries et al. [45](#) estudiaron los cariotipos de aislados clínicos y ambientales de *C. neoformans* de la ciudad de Nueva York por el sistema CHEF, observando extensa variación entre cariotipos electroforéticos de los diferentes pacientes, sin embargo, aislados secuenciales de pacientes con infección crónica o recurrente tenían cariotipos muy similares.

Los resultados de los estudios sobre cariotipo de *C. neoformans* han demostrado la necesidad de estudiar el genotipo con las pruebas de susceptibilidad. En el inicio de la década del 80, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomendó investigaciones que permitiesen la estandarización de las pruebas de susceptibilidad a los antimicóticos [21,26,51](#). La estandarización para las levaduras fue realizada con el método de macrodilución usando el medio RPMI 1640, con L-glutamina, sin bicarbonato, tamponado con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) para un pH 7.0. [40](#) La macrodilución representó un importante avance en la confiabilidad de las pruebas de susceptibilidad, a pesar de ser un método trabajoso y de difícil ejecución en la rutina de laboratorios.

Para evaluar la correspondencia de los resultados producidos por los métodos de macrodilución y microdilución, varios investigadores han realizado ensayos concluyendo que la microdilución en caldo es un método cuyos resultados son

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

equivalentes a aquellos obtenidos con macrodilución, inclusive cuando son analizadas cepas de *C. neoformans*<sup>3, 21</sup>. En Venezuela hay limitada información sobre la susceptibilidad de cepas de *C. neoformans* aisladas de muestras clínicas, así como también del análisis de su cariotipo, por estas razones fueron estudiadas muestras clínicas de esa levadura con los siguientes objetivos: 1) separar las variedades; 2) identificar los serotipos; 3) investigar el perfil del cariotipo electroforético, y 4) estudiar la susceptibilidad a cuatro antimicóticos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### MATERIAL

Treinta (30) cepas de *C. neoformans* aisladas en Caracas (23) y en Maracaibo (7). Estos aislados procedían de 27 pacientes de ambos sexos, de edades variables, con o sin alteración de la función inmune. Todas las muestras fueron colectadas hasta Sanos antes de la presente investigación y mantenidas en agar Sabouraud dextrosa a 4 °C.

De cada paciente fue tomada por lo menos una muestra, para examen microscópico directo y cultivo, en el inicio y durante el tratamiento, cuando fue posible. En caso de fallecimiento durante el tratamiento, fueron analizadas las muestras hasta entonces obtenidas. Se estudiaron aislados secuenciales de sangre, LCR o ambos, de cuatro pacientes con infección primaria y en intervalos que variaron de 1 a 64 días. Las muestras fueron analizadas en relación con las variedades, serotipos, susceptibilidad a anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol. Se realizó la serotipificación y el perfil de cariotipo electroforético en 30 cepas.

#### MÉTODOS

**Identificación de *C. neoformans*.** Se hizo mediante la metodología clásica<sup>34</sup>.

**Separación de variedades de *C. neoformans*.** Se empleó el medio agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB).<sup>32</sup>

**Serotipificación de *C. neoformans*.** La serotipificación se efectuó a través de la prueba de aglutinación en lámina con el kit Crypto Check IATRON Co. Japón.

**Estudio del cariotipo de *C. neoformans*.** Se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Enfermedades Transmisibles de la Facultad de Ciencias

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

Médicas, Universidade Estadual de Campiñas, Brasil.

Fue empleado el método de electroforesis de campo pulsado (PFGE) usando el sistema "contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis" (CHEF), según el protocolo siguiente: Día 1: Tomar 5 a 10 colonias de los cultivos previamente repicados, sobre agar Saboufud dextrosa e inoculado en el medio YEPD (extracto de levadura 1 %, dextrosa 2% y Bactopeptona 2%), en agitación a 30°C, por 18 horas. Día 2: 1) Transferir para tubos de centrifuga esterilizados y colocar en centrifuga refrigerada a 4°C, a 3000 rpm, por 15 minutos. 2) Tomar 100 µL del sedimento y colocar en tubo Eppendorf. 3) Centrifugar el sedimento con 200 µL de agua destilada. Repetir el lavado tres veces. 4) Resuspender el sedimento (cada muestra) en 200 µL de 20 mM del tampón citrato de sodio, pH 5,6; 50 mM EDTA, pH 8,0 y 0,9 M sorbitol, con 2 mg dg la enzima *Trichoderma harzianum* (Sigma L2265). 5) Incubar en baño de María, a 37 °C, por dos o tres horas. 6) Fundir agarosa de bajo punto de fusión 1% (Bio-Rad low melt agarose) y enfriar a 58 °C. 7) Adicionar 560 µL de agarosa de bajo punto de fusión 1% a la suspensión de levaduras y mezclar. 8) Colocar dentro de moldes Bio-Rad y refrigerar a 4 °C. 9) Remover las muestras de los moldes y colocar dentro de placas de cultivo de tejido. 10) Adicionar 2 mL de tampón NET (Tris 0.01 M, pH 7,5; EDTA 0,45 M, pH 8,0; Lauroylsarcosine 1%) más Proteinasa K (Gibco) (0,25 mg/mL). 11) Incubar a 50 °C. Día 3: 1) Lavar cuatro veces con 50 mM EDTA, pH 8,0, incubando en agitación, a la temperatura ambiente, durante 15 a 60 minutos, cada vez. 2) Colocar nuevamente 50 mM EDTA, pH8,0, mantener a 4 °C hasta correr el gel. 3) Correr el gel en el sistema CHEF. Colocar la preparación de agarosa (agarosa ultrapura, Gibco) dentro del molde para el gel del sistema CHEF y esperar 40 minutos para solidificar. Retirar las muestras de los moldes Bio-Rad y distribuir las en los orificios del gel. Uno de los orificios deberá contener el marcador de peso molecular, ADN de *S. cerevisiae*. Luego las muestras son selladas con agarosa líquida. Distribuir dos litros de tampón 0,5 X en la cuba de CHEF y ajustar la temperatura, antes de colocar el gel.

Condiciones de corrida para *Cryptococcus* en el gel CHEF DR-III: temperatura de corrida: 14°C; voltaje: 6,0; % de agarosa: 1; tampón de corrida: 0,5 X TBE; tiempo inicial: 60; tiempo final: 120; tiempo de corrida: 27 horas. Después de retirado el gel es coloreado con solución de bromuro de etidio, durante 30

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

minutos; si es necesario, colocarlo en agua deionizada esterilizada y luego fotografiarlo con película Polaroid en luz ultravioleta.

### **Susceptibilidad a los antimicóticos**

Fue realizada en el Laboratorio Especial de Micología de la Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Brasil según metodología para microdilución en caldo del NCCLS (documento M27-A)[41](#).

Microorganismos: 31 cepas de *C. neoformans* aisladas de muestras clínicas. Se realizaron dos repiques sucesivos de 48 horas, previo al experimento. Para el repique anterior a la prueba fue sembrada una unidad formadora de colonia (UFC). Fue incluida en cada ensayo una muestra de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, como control.

Medio de cultivo: Se utilizó el medio RPMI-1640 con L-glutamina sin bicarbonato de sodio, tamponado con MOPS, pH 7,0 (American Biorganics, Inc.) con dextrosa al 2%.

Lectura: En el momento de la lectura, el crecimiento de microorganismos del pozo control positivo fue comparado con el crecimiento de los pozos con las diferentes concentraciones de antimicóticos estudiadas. La determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) para anfotericina B fue hecha por la total inhibición del crecimiento, mientras que para 5-fluorocitosina y azoles fue realizada por inhibición del crecimiento, aproximadamente de un 50%.

### **Análisis de los resultados**

#### *Análisis de los resultados del cariotipo.*

El Análisis del cariotipo fue realizado según variedades, serotipos y presencia de infección por VIH. La comparación de los perfiles del cariotipo fue hecha por observación: las fotografías de los geles coloreados con bromuro de etidio. Cada banda, mayor o menor, fue comparada con el patrón *S. cerevisiae*. Dos aislados fueron considerados iguales cuando todas las bandas detectables mostraban el mismo peso molecular.

#### *Análisis de los resultados de susceptibilidad a los antimicóticos.*

Para analizar la distribución de los valores de CIMs para antimicóticos se procedió de la siguiente manera: 1. Variación de las CIMs: mayor y menor valor.

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

2. CIM 50: Concentración inhibitoria mínima que inhibió el 50% de las muestras.
3. CIM 90: Concentración inhibitoria mínima que inhibió el 90% de las cepas.
4. CIM Moda: Concentración inhibitoria mínima más frecuente.

### RESULTADOS

#### Variedades y serotipos

De las 30 muestras, 27 (90%) fueron identificadas como *C. neoformans* var. *neoformans*, siendo investigado el serotipo en 26 de ellas. El serotipo A fue observado en todas. Cabe destacar que de las tres cepas de la variedad *gattii*, las cuales fueron aisladas en Maracaibo, dos correspondieron al serotipo B (6,7% ) y una al serotipo C (3,3%)-

#### Infección por VIH

La enfermedad de base más importante relacionada con *C. neoformans* fue la infección por VIH representando el 81 % (21 de 26 pacientes en quienes fue obtenida esa información). La distribución de los serotipos de *C. neoformans* mostró que en pacientes VIH positivos todas las muestras eran del serotipo A. Entre los aislados que procedían de pacientes VIH negativos, tres fueron *C. neoformans* var. *neoformans* y uno *C. neoformans* var. *gattii*.

#### Cariotipos de *C. neoformans*

- Características de los perfiles del cariotipo.

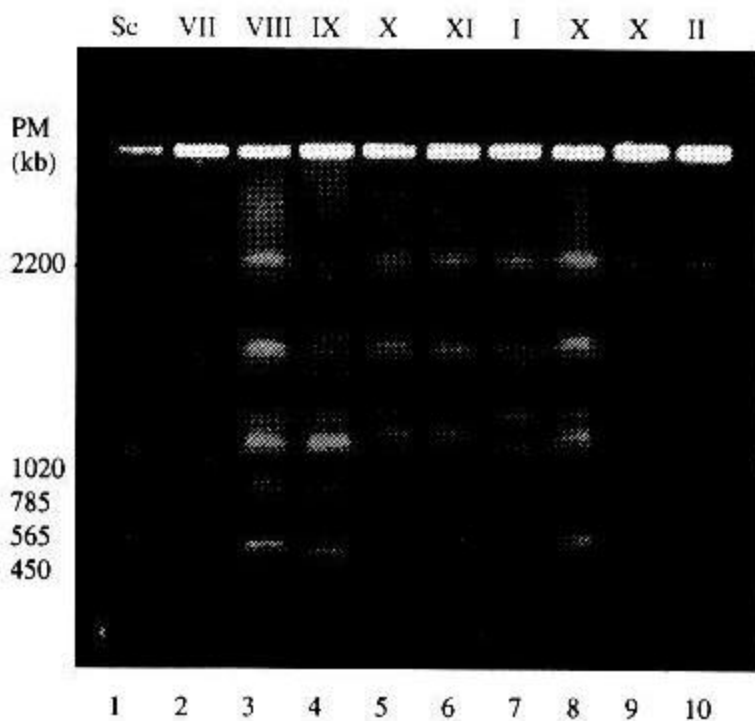
Los perfiles del cariotipo fueron analizados en 29 de las 30 muestras de *C. neoformans*. Se obtuvieron 13 diferentes perfiles que mostraron entre siete y nueve cromosomas, con variación de peso molecular de 450/565 y 2200 kb (I al XIII),

- Perfiles del cariotipo según variedades:

Cuando fueron relacionados los perfiles del cariotipo con las variedades de *C. neoformans*, 26 de las 29 cepas analizadas pertenecían a la variedad *neoformans* y mostraron 11 perfiles de cariotipo (I a XI), con variación de entre siete y nueve cromosomas y peso molecular entre 680 y 2200 kb. (la figura 1 muestra algunos de esos perfiles). Los tres aislados de la variedad *gattii* exhibieron dos perfiles (XII y XIII) con ocho y nueve cromosomas y peso molecular entre 465/565 y 2200 kb. Cromosomas menores, de aproximadamente

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

450/565 kb, fueron encontrados en las cepas de la variedad *gattii* y no entre aquellos de la variedad *neoformans*.



**Fig. 1** Cariotipos electroforéticos ilustrando varios de los perfiles obtenidos de aislados clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans* en Venezuela. La identificación de los perfiles se indica en números romanos. El marcador de peso molecular *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) está en el canal 1. •

- Perfiles del cariotipo según infección por VIH:

En 22 muestras estudiadas, los perfiles fueron muy heterogéneos (I a IV, VI a XI), el número de cromosomas varió de siete a nueve y el peso molecular de 680 a 2200 kb. En las cuatro cepas que fueron aisladas de personas sin infección por VIH, también se observó heterogeneidad. El perfil III fue común entre los aislados de la variedad *neoformans* de pacientes con y sin infección por VIH.

- Perfiles del cariotipo de aislados secuenciales de *C. neoformans* obtenidos de primoinfección de criptococosis:

El análisis de ocho muestras tomadas secuencialmente de cuatro pacientes permitió identificar dos casos individualmente idénticos. En los dos casos



## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

restantes, los perfiles mostraron el mismo número de bandas, sin embargo, hubo variación en los pesos moleculares.

### **Evaluación del perfil de susceptibilidad a los antimicóticos**

- Variaciones de las CIMs, CIM 50 y CIM 90:

Las variaciones de las CIMs, CIM 50 y CIM 90 de los cuatro antimicóticos analizados fueron, respectivamente, para anfotericina B 0,03 a 1 µg/mL, 0,125 µg/ mL y 0,5 µg/mL; para fluconazol de 1 a 16 µg/mL, 8 µg/mL y 8 µg/mL; para itraconazol de 0,03 a 0,25 µg/mL, 0,06 µg/mL y 0,25 (µg/mL y para 5-fluorocitosina de 1 a 64 µg/mL, 4 µg/rnL y 4 µg/mL (Tabla 1).

**Tabla 1**  
**Variaciones de CIMs, CIM 50, CIM 90 y CIM Mo de *C. neoformans* para anfotericina B, fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina**

	Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	5-fluorocitosina
<b>Variaciones de CIMs</b>	<b>0.03-1</b>	<b>1-16</b>	<b>0.03 - 0.25</b>	<b>1 - 64</b>
<b>CIM 50</b>	<b>0.125</b>	<b>8</b>	<b>0.06</b>	<b>4</b>
<b>CIM 90</b>	<b>0.5</b>	<b>8</b>	<b>0.125</b>	<b>4</b>
<b>CIM Mo</b>	<b>0.06</b>	<b>8</b>	<b>0.06</b>	<b>4</b>

-Variaciones de las CIMs según variedades:

Las variaciones no presentaron diferencias significativas para itraconazol cuando fueron analizadas las variedades. Para anfotericina B, 5-fluorocitosina y fluconazol fue observada mayor variación entre *C. neoformans* var. *neoformans* (obteniéndose, respectivamente, 0,03 a 1 µg/mL, 1 a 64 µg/TiL y 1 a 16 µg/mL) comparadas con las CIMs de *C. neoformans* var. *gattii* (encontrándose, respectivamente, 0,03 a 0,06 µg/ mL, 4 a 8 µg/mL y 8 a 16 µg/mL).

- Variaciones de las CIMs según infección por VIH:

El análisis de las CIMs de las drogas estudiadas según presencia o ausencia de infección por VIH, tuvo un comportamiento similar al observado cuando se analizaron según las variedades.

### **Análisis de las CIMs de las drogas estudiadas para aislamientos**

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

### secuenciales de *C. neoformans*.

Los aislados secuenciales en muestra casuística correspondieron a cuatro casos. No hubo diferencias significativas entre los valores de CIMs de los antimicóticos en los cuatro casos.

## DISCUSIÓN

En países latinoamericanos como Brasil y Chile, la criptococosis como enfermedad oportunista en SIDA representa 4,6% y 5,2%, respectivamente.[7,16](#) En Venezuela, las infecciones por hongos representan el 12% en esos pacientes, correspondiendo a criptococosis el segundo lugar.[60](#)

En nuestra investigación, fue confirmado el predominio de *C. neoformans* var. *neoformans*, hallazgo ya referido por Villanueva et al.,[65](#) al estudiar aislados de varias regiones de Venezuela, no obstante los autores no especifican si los pacientes de quienes se obtuvieron las muestras eran o no portadores de infección por VIH. Resultados similares fueron reportados en Brasil, en pacientes con y sin SIDA.[1, 13,22, 35, 38, 39, 47, 56, 59](#)

Los porcentajes de los serotipos de los cultivos estudiados fueron de 89,7% para el serotipo A, 6,9% para el B y 3,4% para el C. Estos hallazgos son comparables con los datos de otras publicaciones que incluyeron muestras clínicas de varias áreas geográficas de Europa, Asia, África, América del Norte y América del Sur.[1,10,22,31,35,43,56](#). Sin embargo, en la única población de Venezuela, correspondiente a Villanueva et al.[65](#), se obtuvo menor porcentaje de sero tipo A (63%) y mas elevado del B (29%), lo cual podría deberse a un mayor número de cepas aisladas de pacientes sin infección por VIH.

En los últimos años han sido reportadas varias investigaciones intentando caracterizar molecularmente a *C. neoformans* y separar cepas para estudios epidemiológicos. El estudio del cariotipo utilizando PFGE ha resultado un método útil y técnicamente simple para distinguir muestras de levadura.[4,24,25,33,48,49,66](#).

El sistema CHEF de PFGE ha sido el más usado para análisis del cariotipo de *C. neoformans*. A pesar de las varias metodologías para extracción de ADN y de las diferentes condiciones de corrida utilizadas, aún no hay conclusiones sobre el perfil del cariotipo de esa levadura. Factores como la presencia de la cápsula de polisacárido de ese microorganismo, que interfiere con la producción de

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

esferoplastos o extracción de ADN, además de la producción de nucleasas que puedan degradar el ADN, han influido en la completa resolución del cariotipo de *C. neoformans*<sup>66</sup>.

En relación con el tamaño del genoma de *C. neoformans*, ha sido reportado un peso molecular entre 15000 y 23000 kb<sup>49,66</sup>.

En nuestra serie, el número de cromosomas varió de siete a nueve y el peso molecular de 450/565 a 2200 kb, estando esos valores de acuerdo con la mayoría de los investigadores,<sup>4,25,33,48,49</sup> y difieren de los resultados de Wickes et al.<sup>66</sup> quienes obtienen un mayor número de cromosomas, pero los pesos moleculares estuvieron dentro del mismo rango. Con excepción de Barchiesi et al.<sup>4</sup> quienes hallaron cromosomas con 1900 kb, el peso molecular del cromosoma mayor de aislados clínicos ha sido de 2200 kb, dato ese también mostrado en nuestra casuística. Sin embargo, tomando en cuenta que las condiciones de corrida no han sido estandarizadas, es posible encontrar diferentes variaciones en el número de cromosomas y peso molecular del cariotipo de *C. neoformans* en las diversas investigaciones. En nuestros resultados fue observado que cromosomas menores de aproximadamente 450/ 565 kb fueron más frecuentes entre aislados de la variedad *gattii*, lo que ya fue referido<sup>49,66</sup>.

La heterogeneidad ha sido otra característica entre los perfiles de cariotipo electroforético observados en *C. neoformans*<sup>4,24,25,30,33,48,66</sup>. En esta serie fueron identificados 11 perfiles entre las 26 cepas de la variedad *neoformans*. Esa variabilidad de perfiles no permitió establecer una asociación de los mismos con áreas geográficas o presencia de infección por VIH. Esos resultados confirmaron las observaciones de Perfect et al.<sup>48</sup> que señalan no haber encontrado un perfil característico del cariotipo de *C. neoformans* aislados de pacientes con infección por VIH.

Estudios de aislados secuenciales han mostrado persistencia de la cepa original en algunos casos de meningitis criptocócica<sup>41</sup>. Además, perfiles del cariotipo de aislados de esta levadura se han mantenido estables en repique *in vitro*, después de varios años. No obstante, se han reportado cepas genéticamente relacionadas y otras con cariotipo diferente<sup>4</sup>. Otro estudio<sup>25</sup> reveló elevada frecuencia de diferentes cariotipos entre aislados secuenciales y demostró cambios durante la infección experimental con *C. neoformans*, sugiriendo que algunos factores como condiciones de temperatura durante la replicación podían

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

estar asociados y que ese fenómeno puede ocurrir independientemente de la terapia antimicótica. En este estudio del perfil del cariotipo en aislados de un mismo episodio de criptococosis en cuatro pacientes se identificaron perfiles idénticos (50%) y otros con variaciones menores (50%).

En vista de la heterogeneidad observada de los perfiles del cariotipo, estudios futuros son necesarios usando metodologías alternativas como aquellas en PCR y otras, para discriminación de muestras de *C. neoformans*.

Algunos autores han señalado la necesidad de estudiar la susceptibilidad de *C. neoformans* a los antimicóticos relacionada al genotipo<sup>12,28,31,62</sup>. Para la criptococosis, antes de aparecer el SIDA, la terapia utilizada era anfotericina B asociada con 5-fluorocitosina. El uso de 5-fluorocitosina ha sido controversial en los pacientes con este síndrome, debido a su toxicidad<sup>5,14,18</sup>. Derivados triazólicos, fluconazol e itraconazol, han sido empleados con relativo éxito en pacientes con y sin SIDA<sup>19,54,57</sup>. A pesar de las diferentes modalidades terapéuticas, los resultados del tratamiento de criptococosis continúan siendo poco favorables, razón por la cual, con la finalidad de conocer la susceptibilidad de *C. neoformans*, se han realizado investigaciones que han utilizado los métodos de dilución en caldo, estandarizados por el NCCLS<sup>3,4,20,23,27,58</sup>.

Entre éstas, las variaciones de las CIMs fueron: para anfotericina B 0,125 a 1 µg/mL; para 5-fluorocitosina de 0,25 a > 64 µg/mL, para fluconazol de 0,5 a 64 µg/mL y para itraconazol de 0,03 a 1 µg/mL. Las CIMs 50 y CIMs 90 presentadas en algunas de esas investigaciones fueron, respectivamente, para anfotericina B de 0,5 y 1 µg/mL, para 5-fluorocitosina de 2 y 8 µg/mL, para fluconazol de 2 y 8 µg/mL y para itraconazol de 0,03 y 0,25 µg/mL. Las variaciones de valores de CIMs, CIM 50 y CIM 90 obtenidas en nuestra serie corroboraron estos hallazgos.

Cuando las variaciones de CIMs fueron analizadas según variedades e infección por VIH, no se observó alteración del comportamiento de esos valores. Entre muestras de la variedad *neoformans*, en su mayoría aisladas de pacientes con infección por VIH, las variaciones más amplias encontradas para anfotericina B, 5-fluorocitosina y fluconazol, probablemente estuvieron influenciadas por una o dos muestras en cada caso que presentaron CIMs más elevadas. Estudios con metodologías basadas en el uso de agar podrían ser usados para confirmar o no el más amplio rango de los valores de CIMs en la variedad *neoformans*.

El perfil de susceptibilidad a la anfotericina B mostró 100% de cepas sensibles,

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

corroborando las observaciones de otros autores ya referidos. El empleo del medio AM3, así como también con E-Test, parece aumentar la discriminación de aislamientos de *Candida* resistentes a la anfotericina B<sup>41</sup>. Es posible que lo mismo ocurra para discriminar cepas de *C. neoformans* sensibles y resistentes a esta droga<sup>37</sup>.

Nuestro estudio reveló 1% de resistencia a 5-fluorocitosina, lo cual es similar a los hallazgos de Polak & Hartman utilizando 5-fluorocitosina asociada a la anfotericina B.

En relación con fluconazol, los resultados de la presente investigación (93,3% de susceptibilidad) concuerdan con la elevada susceptibilidad de cepas de *C. neoformans* a fluconazol referida en la literatura, ya que pocos casos de resistencia han sido reportados<sup>2,6,17,45,46,50</sup>. La susceptibilidad a fluconazol no fue influenciada por la variedad, ya que se encontraron iguales valores de las CIMs Mo de las cepas correspondientes a ambas variedades para ese antimicótico, así como también a anfotericina B y 5-fluorocitosina (CIMs Mo de las variedades *neoformans* y *gattii* fueron 8 µg/mL, 0,06 µg/mL y 4 µg/mL, para fluconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina, respectivamente). Un mayor número de cepas de la variedad *gattii* debería ser estudiado, para verificar ese hallazgo.

Nuestros resultados sobre aislados secuenciales indicaron que la falla terapéutica entre pacientes con criptococosis y SIDA no se deben a cambios de susceptibilidad de las cepas durante el tratamiento, lo cual ya fue señalado en otras investigaciones<sup>12,61,62</sup>.

La susceptibilidad de nuestras muestras a los cuatro antimicóticos analizados sugirieron que en Venezuela en pacientes con criptococosis, independientemente de la variedad y presencia de infección por VIH, podrían ser prescritos los esquemas terapéuticos descritos en la literatura<sup>5,18,29,42,54,q</sup>.

## CONCLUSIONES

En conclusión: 1) *C. neoformans*, serotipo A, fue el más frecuente entre los aislados estudiados; 2) muestras de *C. neoformans* presentaron alta susceptibilidad a la anfotericina B, fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina; 3) no hubo diferencias significativas de las CIMs de las drogas probadas para cepas de *C. neoformans* en relación con muestras de pacientes con y sin infección por

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

VIH; 4) cromosomas de aproximadamente 565 kb o menores fueron observados entre aislados de *C. neoformans* variedad *gattii* y no encontrados en la variedad *neoformans*; 5) los perfiles del cariotipo de los aislados del serotipo A de *C. neoformans* se mostraron heterogéneos; 6) no es posible establecer perfiles del cariotipo asociados con la presencia de SIDA como enfermedad de base; 7) variaciones menores del perfil de CE pueden encontrarse entre aislamientos secuenciales; 8) PFGE usando el sistema CHEF permitió una buena discriminación de perfiles cromosómicos entre aislados de *C. neoformans* var. *neoformans*.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOKI, F.H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N.F.; NISHIMURA K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A.Z.; BRANCHINI, M.L. *New PCR primer pairs specific for Cryptococcus neoformans serotypes A or B prepared based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprint pattern analyses*. J. Clin. Microbiol. (In press).
2. ARMENGOU, A.; PORCAR, C.; MASCARO, J.; GARCÍA BRAGADO, F. *Possible developmem of resistance to Fluconazole during suppressive therapy for AIDS associated Cryptococcal meningitis*. Clin. Infect. Dis. 1996; 23: 1337-38.
3. BARCHIESI, E.; COLOMBO, A.; Mc GOUGIE, D.; RINALDI, M. G. *Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal suceptibility testing of yeast by using National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard*. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2494-2500.
4. BARCHIESI, E.; HOLLIS, R.; MESSER, S.A.; SCALISE, G.; RINALDI, M.G.; PFALLER, M.A. *Electrophoretic kariotype and in vitro antifungal suscepibility of Cryptococcus neoformans isolates from AIDS patients*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1995; 23: 99-103.
5. BENNETT, J. E.; DISMUKES, W. E.; DUMA, R. J.; MEDOFF, G.; SANDE, M. A.; GALLIS, R.; LEONARD, J.; FIELOS, B. T.; BRADSHAW, M.; HAYWOOD, H.; Mc GEE, Z. A.; CATE, T. R.; COBS, C. G.; WARNER, J. F.; ALLING, D.W. *A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis*, N. Eng. Jour. Med. 1979; 301: 126-31.
6. BERG, J.; CLANCY, C. J.; YU, C. Y.; NGUYEN, M. H. *The hidden danger of*

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

*primary fluconazole prophylaxis in AIDS: emergence of fluconazole resistance in C. neoformans*. Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 8-13, 1997. Abstracts. Parma, Federazione Italiana Micopatologia Umana ed Animale. 1997. pg. 89. (Abstractoral, O54).

7. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS DO MUNICIPIO DE SAO PAULO / Programa de DST/AIDS, Prefeitura do Municipio de Sao Paulo. 1:13, 1997, Sao Paulo.

8. BOTTONE, E. J.; SALKJN, I. F.; HURD, N. J.; WORMSER, G. P. *Serogroup distribution of Cryptococctis neoformans in patients with AIDS*. J. Infect. Dis. 1987; 156:212.

9. BRANDT, M. E.; BRAGG, S. L.; PINNER, R. *Multilocus enzyme typing of Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 2819-33.

10. CALVO, B.; FISCHMAN, O.; PIGNATARI, A.; DELBIANCO, R.; ZAROR, L. *Variedades y serotipos de Cryptococcus neoformans en pacientes con SIDA y neurocriptococosis en Sao Paulo. Brasil*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1990; 32: 480-82.

11. CASADEVALL, A.; FREUNDLICH, L.F.; MARSH, L.; SCHARF, M. *Extensive allelic variation in Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 1080-84,

12. CASADEVALL, A.; SPITZER, E. D.; WEEB, D.; RINALDI, M. *Susceptibility of serial Cryptococcus neoformans isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and Fluconazole*. Antimicrob. Agents. Chemothera. 1993; 37: 1383-86.

13. CHANO, M.R.; PANIAGO, A.; WANKE, B.; LAZERA, M.; FUJU, E.; AGUIAR, E.; CANDIA, M. *Estudo das variedades de Cryptococcus neoformans isolados de pacientes internados no hospital universitario de Campo Grande - Matto Grosso do sul*. In: Congresso Brasileiro de Micologia, 2. Rio de Janeiro, 17 a 21 abril 1998. Temas Livres. Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Micologia, 1998. p. 66. (Resumo A46).

14. CHUCK, S.L.; SANDE, M.A. *Infections with Cryptococcus neoformans in the acquired immunodeficiency syndrome*. N. Eng. Jour. Med. 1989;321:794-9.

15. CRAMPIN, A.C.; MATTHEWS, R.C.; HALL, D.; EVANS, E.G.V. - *PCR fingerprinting Cryptococcus neoformans by random amplification of polymorphiç DNA*. J. Med. Veter. Mycol. 1993;31:463-65.

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

16. DABANCH, J.; MARCOTTI, A.; BIDART, T.; CAMPOS, I.; NORTHLAND, R.; ALLENDES, G.; WOLFF, M, *Evolución de eventos defintorios de SIDA 1988-1996*. 404 casos. In: Congreso Chileno de Infectología, 13, Viña del Mar. 23-25 de octubre, 1996. Temas libres. Viña del Mar, 1996, p. 9.

17. DAVEY, K.G.; JOHNSON, E.M.; HOLMES, A.D.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D.W. *Emergence of drug resistant Cryptococcus neoformans strains during maintenance fluconazole (FLZ) treatment in AIDS patients with cryptococcosis*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY. 13, Panna 8-13, June 1997. Abstracts. Parma, Federazione Italiana Micopatologia Umana ed Animale. 1997. p. 202. (Abstract poster, P 493).

18. DISMUKES, W.E.; CLUOD, G.; GALLIS, H.A.; KERKERING, T.M.; MEDOFF, G.; CRAVEN, P.C.; KAPLOWITZ, L.G.; FISHER, J.F.; GREGG, C.R.; BOWLES, R.N.; SHADOMY, S.; STAMM, A.M.; DIASIO, R.B.; KAUFMANN, L.; SOONG, S.; BLACKWELDER, W.C. *Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks*. N. Eng. J. Med. 1987; 317:335-41.

19. DROMER, F; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; BRUGIERE, O.; LETTENEUR, L. AND THE FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. *Comparison of the efficacy of amphotericin B and Fluconazole in the treatment of cryptococcosis in Human Immunodeficiency Virus negative patients: Retrospective analyses of 83 cases*. Clin. Infect. Dis., 1987; 22 (suppl. 2):S154-60.

20. ESPINEL INGROFF, A.; KERKERING. T.M.; GOLDSON, P.R.; SHADOMY, S. *Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests*. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 1089-94.

21. ESPINEL INGROFF, A.; KISH, JR., C.W.; KERKERING. T.M.; FROMTLING, R.A.; BARTIZAL, K. E.; GALGANI, J.N.; VILLAREAL, K.; PHALLER, M.A.; GERARDEN. T; RINALDI, M.G.; FOTHERGILL, A.; *Collborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests*. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 3138-45.

22. FERNANDES BORDIGNON, G.; MURO, M.D.; DUPONT, B.; QUEIROZ-TELLES, F. *Quimiotipagem e soratipagem de Cryptococcus neoformans*. In: Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis, 6, Montevideo, 21 al 24 de marzo, 1996. Abstracts, Montevideo, 1996. p. 94.

23. FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J.S. In vitro susceptibilities of clinical and



## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40: 822-24.

24. FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J.S.; CURRIE, B.P.; CASADEVALL, A. *Molecular epidemiology of Cryptococcus neoformans in Brazil and the United States: Evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure.* J. Clin. Microbiol. 1997;35:2243-51.

25. FRES, B.; CHEN, F.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. *Karyotype instability in Cryptococcus neoformans infections,* J. Clin. Microbiol. 1996; 34; 1531-34.

26. FROMTLING, R. A.; GALGANI, J.N.; PFALLER, M. A.; ESPINEL INGROFF, A.; BARTIZAL, K. E; BARLETT, M. S.; BODY, B. A.; FREY, C.; HALL, G. S.; ROBERTS, G. D.; NOLTE, F. B.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SUGAR, A. M.; VILLAREAL, K. - *Multicenter Evaluation of a Broth Macrodilution Antifungal Susceptibility Test for Yeasts.* Antimicrob. Agents Chemother., 1993;37:39-45.

27. GHANNOUM, M. A.; PFALLER, M. A.; TUMBERLAND, M.; MBIDDE, E. K.; MESSER, S. A; BELANGER, P.; JESSUP, C. J. - *Cryptococcus neoformans Susceptibility Testing: Comparison between M27 - T Standard Method and Yeast Nitrogen Base Microtiter Method.* In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY; 37, Toronto, September 28 - October 1, 1997. Abstracts. American Society for Microbiology, 1997. (Abstract poster, D-140).

28. HAYNES, K. A.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. J.; CLARKE, J. C. K.; EMILIANUS, R.; ATKISON, C.; CANN, K. J. - *Involvement of Multiple Cryptococcus neoformans Strains in a Single Episode of Cryptococcosis and Reinfection with Novel Strains in Recurrent Infection Demonstrated by Random Amplification of Polymorphic NA and DNA Fingerprinting.* J. Clin. Microbiol., 1995;33:99-102.

29. JUST-NÜBLING, G. & KLINIKUM, J. W. - *Combination therapy of cryptococcosis in HIV infected patients.* In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13, Parma, 8-13 June, 1997. Abstracts. Parma, Federazione Italiana Micopatologia Umana ed Animale, 1997. p,56 (Abstract symposium, S 63).

30. KLESPER, M. E. & PFALLER, M. A. - *Variation in Electrophoretic Karyotype (EK) and Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates of Cryptococcus neoformans in a University-Affiliated Teaching Hospital from 1987-94.* In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

37, Toronto, September 28 - October 1, 1997. Abstracts. American society for Microbiology, 1997, (Abstract poster, C-12).

31. KWON CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E.- *Epidemiologic differences between the two varieties of Cryptococcus neoformans*. Am. J. Epidemiol., 1984; 120: 126-30.

32. KWON CHUNG, K. J.; POLACHEK, I; BENNETT, J. E.- *Improved diagnostic medium for separation of Cryptococcus neoformans var. neoformans (Serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var. gattii (Serotypes B and C)*. J. Clin. Microbiol., 1982; 15: 535-37.

33. KWON CHUNG, K. J.; WICKES, B. L.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D.; ELLIS, D.; HOWARD, D.H. *Virulence, Serotype. and Molecular Characteristics of Environmental Strains of Cryptococcus neoformans var. gattii*. Infect. Immun., 1992; 60: 1869-74.

34. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.- *Micología Médica. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed.rev.aum. Sao Paulo, Sarvier, 1991:545-608.

35. LACAZ, C. S. & RODRIGUES, M. C.- *Serotipagem do Cryptococcus neoformans*. Rev. Bras. Med., 1983:40:297-300.

36. LOPES MARTÍNEZ, R.; CASTAÑÓN OLIVARES, L. R.; RÍOS ROSAS, C.; BARRIGA ANGULO, G.- *Frequency of cryptococcosis agents in México*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13, Parma, 8-13 June, 1997. Abstracts. Parma, Federazione Italiana Micopatologia Umana ed animale, 1997. p.106. (Abstract poster, 113).

37. LOZANO CHIU, M.; ARIKAN, S.; MARTÍN DIEZ, F. M.; PAETZNICK, V; RODRÍGUEZ TUDELA, J.L.; REX, J. H. -*A Two - Center study of Antibiotic Medium 3(AM3) Broth for Detection of Amphotericin B (amV)-Resistant Isolates of Candida spp. (CAND) and Cryptococcus neoformans (CNEO)*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 38, San Diego, 24-27 September, 1998. Abstracts. American Society for Microbiology. 1998. p.456. (Abstract, J-19b).

38. MELO, N. T; LACAZ, C. S.; CHARBEL, C. E.; PEREIRA, A. D.; HEINS VACCARI, E. M.; FRANCA NETTO, A. S.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.- *Quimiotipagem do Cryptococcus neoformans. Revisão da literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego*

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

do medio de CGB no estudo daquela levedura. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo, 1993; 35:469-78.

39. MOREIRA, C. L. N.; FRANZOT, S. P.; HAHN, R. C.; PRÍMOLA, N. S.; MORAES, E. M. P.; HAMDAN, J. S.- *Epidemiologia das amstras de Cryptococcus neoformans isoladas em Belo Horizonte e no Rio de Janeiro: sorogrupagem, sorotipagem e tipagem bioquímica.* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2 Rio de Janeiro, 17 a 21 abril 1998. temas Livres. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Micologia, 1998. p.97. (Resumo A 110).

40. NATIONAL COMMITTEE for CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).- *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Proposed standard.* NCCLS: v. 12.22 p. M27-P, 1992, Villanova, Pa.

41. NATIONAL COMMOTEE for CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).- *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard,* NCCLS: v. 17.28 p.M27-A. 1997, Wayne, Pa.

42. NGUYEN, M. H.; BARCHIESI, E; Mc GOUGH, D. A.; YU, V. L.; RINALDI, M.,- *In vitro Evaluation of Combination of fluconazol and Flucytosine against Cryptococcus neoformans var. neoformans.* Antimicrobial. Agents Chemother., 1995; 39:1691-5.

43. NISMKAWA, M. M.; LETTE, P; CAVALCANTE, M. A. S.; LAZÉRA, M.; BARBOSA, G. G.; BALASSIANO, B. R.; TRILLES, L; BEZERRA, C. C. F.; MACEDO, R. L; WANKE, B.- *Sorotipagem de isolados de Cryptococcus neoformans de origem clinica e ambiental do Brasil.* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA. 2 Rio de Janeiro, 17 a 21 abril 1998. Temas Livres. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Micologia. 1998. p.95. (Resumo A 104).

44. ORDOÑEZ, N. & CASTAÑEDA. E- *Varieties and serotypes of Cryptococcus neoformans clinical isolates isolates in Colombia.* In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13, Parma. 8-13 June, 1997. Abstracts. Parma, Federazione Italiana Micopatologia Umana ed Animale, 1997.p.121.(Abstrast poster, 168).

45. ORNI WASSERLAUF, R.; SEGMAN IGRA, Y; EKHAKOV, E.; BASH, I.; POLACHEK. I; GILADI, M.- *Fluconazole-resistant Cryptococcus neoformans isolated from an immunocompetent Patient without prior exposure to fluconazole.* In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 38, San Diego, 24-27 September, 1998. Abstracts. American

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

Society for Microbiology, 1998. p.458. (Abstract, J-24).

46. PAUGAM, A.; DUPOUY CAMET, J.; BLANCHE, P.; GANGNEUX, J. P.; TOURTE SCHAEFER, C.; SICARD, D.- *Increased fluconazole resistance of Cryptococcus neoformans isolated from a patient with AIDS and recurrent meningitis.* Clin. Infect Dis., 1994; 19:975-76.

47. PAULA, C. R.; ITO, C. H.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; CORREA, B.; MINAMI, P. S.-*Biochemical serotyping and other physiological characteristics of 40 Cryptococcus neoformans samples isolates from clinical materials in Brazil.* Rev. Ibérica Micol., 5 (suppl. 1): 105, 1988. (Abstract P 219) (Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. 10, Barcelona, 1988].

48. PERFECT, J. R.; KETABCHI, N.; COX, G. M.; IGRAM, C. W.; BEISER, C. L. *kariotyping of Cryptococcus neoformans as an Epidemsological Tool.* J. Clia Microbiol.; 1993; 3 1 :3305-09.

49. PERFECT, J. R.; MACEE, B. B.; MAGEE, P. T.- *Separation of Chromosomes of Cryptococcus neoformans by pulsed Field Gel Electrophoresis.* Infect Immun; 1989; 57:2624-27.

50. PATTERMANS, W.; BOBBAERS, H.; VERHAEGEN, J., VENDEPITTE, J.- *Fluconazole-Resistant Cryptococcus neoformans var. gattii in an AIDS patient.* Acta Clin. Belg; 1993; 48:405-9.

51. PFALLER, M. A.; RINALDI, M. G.; GALGANI, J. N.; BARTLETT, M. S.; BODY, B. A.; ESPINEL INGROFF, A.; FROMTLING, R. A.; HALL, G. S.; HUGHES. C. E.; ODDS, F C.; SUGAR, A. M- *Collaborative Investigation of Variables in Susceptibility testing of yeasts.* Antimicrob. Agents Chemother; 1990; 34:1648-54.

52. POLACHECK, I. & MUYEMBE, T.- *The prevalence of cryptococcal serotypes in Taire.* Rev. Iber. Micol; 5 (suppl 1 ): 47, 1988. (Abstract 0-145).

53. POLAK, A, & HARTMAN, P.G.- *Antifungal chemoltherapy-Are we winning?* Prog. Drugs Res; 1991;37:181-269.

54. POWDERLY, W. G.- *Recent advances in the Management of Cryptococcal meningitis in Patients with AIDS.* Clin. Infect. Dis; 1996; 22 (suppl. 2): S119-23.

55. RINALDI, M. G.; DRUTZ, D. J.; HOWELL. A; SANDE, M. A.; WOFSY. C. B.; HADLEY, W. K.- *Serotypes of Cryptococcus neoformans in patients wirh AIDS.* J. Infect Dis; 1986:153:642.

56. ROZENBAUM, R. & GONCALVES, A. J. R.- *Clinical Epidemiological Study of*

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

171 *Cases of Cryptococcosis*. Clin. Infect. Dis; 1994; 18:369-80.

57. SAAG, M. S.; POWDERLY, W. G.; CLOUDG, A.; ROBINSON, P.; GRIECO, M. R.; SHARKEY, P. K.; THOMPSON, S. E.; SUGAR, A. M.; TUAZON, C. U.; FISHER, J. F.; HYSLOP, N.; JACOBSON, J. M.; HAFNER, R.; DISMUKES, W. E.; AND THE NIAID MYCOSES STUDY GROUP AND THE AIDS CLINICAL TRIALS GROUP- *Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis*. N. Engl. J. Med; 1992; 326:83-9.

58. SANATI, H.; MESSER, S.A.; PFALLER, M. A.; WITT, M.; LARSEN, R.; ESPINEL INGROFF, A.; GHANNOUM, M.A.- *Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of Cryptococcus neoformans against Fluconazole*. J. Clin. Microbiol; 1996; 34:1280-82.

59. SANT'ANNA, J. V.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; MELHEM, M. S. C.- *Varieties of Cryptococcus neoformans in the state of Sao Paulo, Brazil*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13 Parma, 8-13 June, 1997. Abstracts. Parma, Federazione Italiana Micopatologia Umana ed Animale, 1997, p.119. (Abstract poster, P 161).

60. SANTIAGO, A. R.; HERNÁNDEZ, E.; ACEITUNO, H.; PABON, R.; FERREIRA, T.- *Prévalence des mycoses chez les patient atteints du sida a l'Hospital Universitaire de Caracas (Venezuela), janvier 1985-mars 1996*. J. Mycol. Méd ; 1997 ; 7 :51-2.

61. SPITZER. E. D.; SPITZER, S. G.; FREUNDLICH, L. F.; CASEDEVALL, A.- *Persistence of initial infection in recurrent Cryptococcus neoformans meningitis*. Lancet, 1993; 341: 595-96.

62. SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K.A.; MORAN, G.; SHANLEY, D.; COLEMAN. D.J.- *Persistence, Replacement, and Microevolution of Cryptococcus neoformans strins in recurrent Meningitis in AIDS patients*. J, Clin. Microbiol; 1996; 34: 1739-44.

63. VAN DER HORST, C. M.; SAAG, M.; CLOUD, G.; HAMILL, R.; GRAYBILL, J. R.; SOBEL, J.D.; JOHNSON, P. C.; TUAZON, C. U.; KERKERING, T.M.; MOSKOVITZ, B.L.; POWERLY, W. G.; DISMUKES, W. E.; THE NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES MYCOSIS STUDY GROUP; AIDS CLINICAL TRIALS GROUP.- *Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome*. N. Engl. J. Med; 1997; 337:15-21

64. VARMA, A. & KWONG CHUNG, K. J.- *Restriction Fragment Polimorphism in*

## EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y

*Mitochondrial DNA of Cryptococcus neoformans*. J. Gen. Microbiol; 1989; 135:3353-62.

65. VILLANUEVA, E.; MENDOZA, M.; TORRES, E.; ALBORNOZ, M.; CAVAZA, M. E.; URBINA, G.-*Serotipificación de 27 cepas de Cryptococcus neoformans aisladas en Venezuela*. Acta Cient. Venez; 1989; 40:151-154.

66. WICKES, B. L.; MOORE, T. D. E.; KWON CHUNG, K. J.-*Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of Cryptococcus neoformans*. Microbiology, 1994; 140:543-50.