



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE ERIC-PCR Y
REP-PCR DE CEPAS DE *Cryptococcus neoformans* AISLADAS DE
PACIENTES VIH POSITIVO. HOSPITAL REGIONAL
LAMBAYEQUE. ENERO 2018 – MARZO 2019.**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

AUTORA:

Br. VENTURA FLORES, MARISOL

ASESORA:

Dra. VERGARA ESPINOZA, MARTHA ARMINDA

CO-ASESOR:

M.Sc. VENTURA FLORES, ROBERTO

LAMBAYEQUE - PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE ERIC-PCR Y
REP-PCR DE CEPAS DE *Cryptococcus neoformans* AISLADAS DE
PACIENTES VIH POSITIVO. HOSPITAL REGIONAL
LAMBAYEQUE. ENERO 2018 – MARZO 2019.**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

Presentado por:

Br. Ventura Flores, *Marisol*

Aprobado por:

Dr. Chimoy Effio, Pedro Jorge

Presidente

Dra. Vásquez del Castillo, Ana María del Socorro

Secretaria

Dra. Llontop Barandiarán, Gianina

Vocal

Dra. Vergara Espinoza, Martha Arminda

Patrocinadora

EPIGRAFE

*Los ideales que iluminan mi camino
una y otra vez, y me han dado el coraje para
enfrentar la vida con alegría han sido: La
fe, la amabilidad y la verdad.*

Albert Einstein

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

*Elmer y Trinidad, por ser
la motivación más grande, en
toda esta etapa de mi vida.*

A mis Hermanos:

*Rosa, Roberto, Vilma,
Fernando, Elena y Esperanza,
por ser mi soporte en todo
momento.*

MARISOL

AGRADECIMIENTO

A DIOS, por ser la luz y guía en mi camino. Por haberme brindado la dicha de hacer realidad esta meta y el don de equivocarme para nunca dejar de aprender.

A la Dra. Martha Vergara Espinoza por los conocimientos y experiencias brindadas en todo momento, ya que gracias a sus valiosos consejos y aportes se llegó a buen término la presente investigación.

De manera muy especial al mí querido Hno Roberto Ventura Flores, por su admirable labor educativa y consejos brindados en mi vida académica y personal

A mis fieles e incondicionales amigos Karina Villalobos, Héctor Vilcabana, Zory Saavedra, por su amistad infinita y desearme siempre lo mejor en el transcurso de mi formación y el desarrollo del trabajo de tesis.

De manera muy especial a mis amigos y compañeros. Guillermo Uceda, Kevin Colbert, Cristian Palomino, Nury Lopez, Keila Vázquez y a todos mis amigos que de manera desinteresada colaboran en el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, mi sincero agradecimiento a la dirección de investigación del Hospital Regional Lambayeque, sobre todo al Blgo. Luis Miguel Serquén López, por su confianza y apoyo, durante el desarrollo del presente trabajo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	iii
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I. DISEÑO TEÓRICO.....	4
1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
2. BASES TEÓRICAS	8
CAPITULO II. DISEÑO METODOLÓGICO	11
1. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	11
2. Población y Muestra.....	11
3. Técnica e instrumentos de recolección de datos	11
4. Procedimiento General	11
4.1. Reactivación de cepas de <i>C. neoformans</i>	11
4.2. Caracterización molecular de cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> mediante ERIC-PCR y REP-PCR.....	12
4.3. Análisis y procesamiento de datos.....	17
4.4. Consideraciones éticas.	19
CAPITULO III. RESULTADOS.....	20
1. Caracterización molecular.....	20
1.1. Criterios de ERIC-PCR y REP-PCR.	27
CAPITULO IV. DISCUSIÓN.....	28
CAPITULO V. CONCLUSIÓN.....	32
CAPITULO VI. RECOMENDACIONES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Patrones de caracterización molecular mediante ERIC -PCR de cepas de <i>C. neoformans</i> aisladas de pacientes VIH positivo. Hospital Regional Lambayeque. Enero 2018 – Marzo 2019.	22
Tabla 2. Patrones de caracterización molecular mediante REP -PCR de cepas de <i>C. neoformans</i> aisladas de pacientes VIH positivo. Hospital Regional Lambayeque. Enero 2018 – Marzo 2019.	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reactivación de cepas de <i>C. neoformans</i> aisladas de pacientes VIH	12
Figura 2. Lisis, extracción y purificación de ADN <i>Cryptococcus neoformans</i> ((Invitrogen, 2012).	14
Figura 3. Condiciones termodinámicas de las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR programada en el termociclador Eppendorf.	15
Figura 4. Dendrograma según ERIC-PCR de 19 cepas de <i>C. neoformans</i> generado por UPGMA. (La escala inferior corresponde a la similaridad entre aislados basada en el coeficiente de DICE).	23
Figura 5. Dendrograma según REP - PCR de 19 cepas de <i>C. neoformans</i> generado por UPGMA. (La escala inferior corresponde a la similaridad entre aislados basada en el coeficiente de DICE)	26

RESUMEN

Objetivo. Caracterizar molecularmente mediante la técnica ERIC-PCR y REP-PCR cepas de *Cryptococcus neoformans* aislado de pacientes con VIH positivo. Hospital Regional Lambayeque. Enero 2018 - Marzo 2019. **Diseño Metodológico.** Se analizaron las cepas de *C. neoformans* aislados de Líquido ceforraquídeo de pacientes de VIH positivo, empleando el medio agar Sabouraud. Se realizó la caracterización molecular mediante los marcadores ERIC-PCR y REP-PCR, registrando los geles con el software Quantity One-BIORAD. Para el agrupamiento de las cepas se usó el algoritmo UPGMA, generando los dendrogramas. **Resultados.** Se trabajó con 19 cepas correspondientes a *C. neoformans* de muestras de Líquido ceforraquídeo de pacientes con VIH positivo, los productos amplificados en cada perfil (*fingerprints* o electroferotipos) en ERIC-PCR oscilaron entre 5 a 20 bandas y en REP-PCR se obtuvieron 4 a 16 bandas por perfil electroforético. **Conclusiones.** Se caracterizó molecularmente las cepas de *C. neoformans* de pacientes VIH positivo obteniéndose diez patrones para ERIC-PCR y doce para REP-PCR (ID 0,99 y Test. M= 0,89).

Palabras clave: *Cryptococcus neoformans*, pacientes VIH positivo, Líquido Ceforraquídeo, ERIC-PCR, REP-PCR.

ABSTRACT

Objective. Molecularly characterize using the ERIC-PCR and REP-PCR technique of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from HIV positive patients. Lambayeque Regional Hospital. January 2018 - March 2019. **Methodological Design.** Strains of *C. neoformans* isolated from Cerebrospinal fluid from HIV positive patients were analyzed, using Sabouraud agar medium. Molecular characterization was performed using the ERIC-PCR and REP-PCR markers, registering the gels with the Quantity One-BIORAD software. For the grouping of the strains the UPGMA algorithm was used, generating the dendrograms. **Results.** We worked with 19 strains corresponding to *C. neoformans* of cerebrospinal fluid samples of HIV positive patients, the amplified products in each profile (fingerprints or electroferotypes) in ERIC-PCR ranged from 5 to 20 bands and in REP-PCR 4 were obtained 16 bands per electrophoretic profile. **Conclusions.** *C. neoformans* strains of HIV positive patients were molecularly characterized, obtaining ten standards for ERIC-PCR and twelve for REP-PCR (ID 0.99 and Test. M = 0.89).

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, HIV positive patients, Cerebrospinal fluid, ERIC-PCR, REP-PCR.

INTRODUCCION

La meningitis causada por *Cryptococcus neoformans*, una levadura que afecta a personas inmunodeprimidas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y en algunos casos a individuos inmunocompetentes (Vidal, Penalva De Oliveira, Dauar, & Boulware, 2013). Esta infección es causada por las inhalación de esta levadura la misma que tiene tropismo por el sistema nervioso central (Cidiane, Rocha, Pereira, & Caligorne, 2016). La enfermedad es de distribución mundial y afecta aproximadamente a un millón de personas que están viviendo con el VIH. (Vidal *et al.*, 2013).

Se calcula que es la cuarta infección oportunista común en pacientes con VIH, cerca de un millón de casos diagnosticados anualmente en el mundo. En el sudeste asiático se estima 120 casos por cada 1. 000 infectados por año, implicando que las especies de *Cryptococcus* han causado brotes de enfermedades infecciosas recientes en las regiones del noreste del Pacífico de Canadá y Estados Unidos, estas tendencias ponen en relieve la importancia de comprender la variabilidad genética. (Chan, Lye, Win, Chow, & Barkham, 2014; O'Meara & Alspaugh, 2012); así mismo la meningoencefalitis es la manifestación clínica más común y potencialmente mortal de la criptococosis generando una alta tasa de morbilidad y mortalidad con más de 400,000 muertes dentro de los tres meses posteriores al inicio de la enfermedad, debido al creciente número de pacientes inmunosuprimidos (Escandón & Montilla, 2010; Martins *et al.*, 2015; Sanchini *et al.*, 2014).

Latinoamérica, es la tercera región con más casos de meningitis relacionada con VIH. En el Perú la prevalencia de criptococosis en pacientes con diagnóstico de VIH positivo, afecta más al sexo masculino entre los 25 a 35 años (Contreras Mendoza, González Méndez, & De la Cruz Vargas, 2017). Sin embargo su verdadera incidencia se desconoce principalmente en los grupos de riesgo debido a que la criptococosis no es una enfermedad de notificación obligatoria en el mundo, excepto en una provincia de Canadá (Escandón & Montilla, 2010) a esta realidad no escapa ni el Perú ni el departamento de

Lambayeque, ya que no se han reportado referencias relacionadas con la incidencia de la Criptococosis.

La criptococosis afecta a pacientes con alguna enfermedad de base o aquellos que presentan una alteración en su respuesta inmune celular haciéndoles susceptibles a desarrollar la enfermedad (Restrepo, 2013) pero también depende de la capacidad patogénica asociada a múltiples factores de virulencia como la cápsula, proteínas enzimáticas, producción de melanina y a su capacidad de adherencia siendo la meningitis criptocócica la más frecuente y la máxima expresión del neurotropismo de esta levadura, dicha migración se debe a la secreción de la enzima ureasa que actúa debilitando la pared vascular endotelial y con ello la oportunidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Almeida, Wolf, & Casadevall, 2015; May, Stone, Wiesner, Bicanic, & Nielsen, 2016).

En la actualidad se emplean diversas técnicas de caracterización molecular, las cuales son herramientas necesarias para determinar la variabilidad genética de levaduras y mohos de manera que complementan a los procedimientos fenotípicos, extendiendo los alcances de la epidemiología. Estas técnicas son variados, así se tiene la REP-PCR, que se basa en la utilización de marcadores que hibridan de forma específica secuencias de ADN repetitivas (secuencias rep), que se encuentran distribuidas en el cromosoma de los hongos, siendo las más utilizadas las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias ERIC denominadas secuencias consenso repetitivas intergénicas de *Enterobacteriaceae*. Por otro lado, existen pocos estudios que utilizan marcadores altamente resolutivos como técnicas de REP-PCR y ERIC-PCR las cuales pueden exponer las posibles rutas que han tomado dichas cepas para afectar a poblaciones vulnerables con VIH. (Dehghan & Rahimian, 2016; Dou, Xu, Wang, & Li, 2014; Fernandez, 2004).

En el departamento Lambayeque, según registros del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional Lambayeque, entre los años 2013 a 2018 se presentaron 19 casos, confirmados por cultivo, de meningitis por *C. neoformans* en pacientes con VIH, sin embargo se desconocen las características moleculares de las cepas aisladas, así mismo no se han encontrado referencias que revelen las características genéticas de la especie circulante en la Región Lambayeque; todo esto motivó el cuestionamiento

¿Cuáles son las características moleculares, mediante ERIC-PCR y REP-PCR de cepas de *Cryptococcus neoformans* aislados de pacientes VIH positivo del Hospital Regional Lambayeque. Enero 2018 - Marzo 2019?. Considerando que, existe una variabilidad genética de patrones debido a diferentes presiones selectivas, se programó y ejecutó la presente investigación cuyo objetivo fue caracterizar molecularmente mediante la técnica ERIC-PCR y REP-PCR de cepas de *C. neoformans* aisladas de pacientes VIH positivo. Hospital Regional Lambayeque. Enero 2018 – Marzo 2019. Con los resultados obtenidos se pretende dar inicio al conocimiento de la variabilidad genética de las cepas de *Cryptococcus neoformans* causante de meningitis en pacientes con VIH y de las diferencias o similitudes entre las cepas circulantes en la Región Lambayeque.

CAPITULO I. DISEÑO TEÓRICO

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

A nivel mundial, la infección criptocócica es causada principalmente por dos especies, *C. neoformans* y *C. gattii* (Castañón *et al.*, 2009; Cogliati, 2013; De Aguiar *et al.*, 2017). Entre las dos especies, *C. neoformans* var. *grubii* es la responsable de la criptococosis en Asia (Park, Kim, Joo, & Hwang, 2014) y América (De Aguiar *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2017). Ambas especies causan infecciones pulmonares y del sistema nervioso central. Contienen una serie de subgrupos genéticamente diversos que defieren en su ecología y epidemiología, de los ocho tipos moleculares implicados en las especies del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*, *C. neoformans* se compone de 4 variedades y tres serotipos; es decir VNI y VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D) y un híbrido entre ellos el VNIII (serotipo AD); mientras que *C. gattii* se compone de VGI, VGII, VGIII y VGIV, que corresponden a los serotipos B o C (Castañón *et al.*, 2009; Escandón & Montilla, 2010; Park *et al.*, 2014).

Las técnicas moleculares no se usan en el diagnóstico de rutina, son empleadas para la detección de secuencias genéticas específicas del complejo *Cryptococcus* a partir de muestras clínicas y cultivos. Así por ejemplo, en la neurocriptococosis en pacientes con VIH, se evaluaron 27 aislamientos de *C. neoformans* aislados de LCR en pacientes seropositivos que según sus características fenotípicas correspondían al serotipo A y al tipo de apareamiento MAT α , sin embargo de acuerdo a los resultados del PCR-RFLP del gen URA5, 24 de los aislamientos correspondían al genotipo VNI y en tres de ellos no lograron amplificar el fragmento (Sánchez *et al.*, 2017).

La tipificación de secuencias multilocus (MLST) también ha sido empleada para comprender la epidemiología de la criptococosis utilizando el esquema de siete locus, tanto para calcular la diversidad de alelos y nucleótidos por cada locus de *C. neoformans* en sus variedades *grubii*, como para determinar los dendrogramas que evalúan las

relaciones filogenéticas. De 101 aislamientos previamente aislados de Asia y Europa, 8 fueron identificados como híbridos (8%) los restantes eran no híbridos de tipo de apareamiento α . Los *C. neoformans* variedad *neoformans* mostraron mayor alelo y diversidad de nucleótidos en comparación con *C. neoformans* variedad *grubii*, por lo que representan una mayor variabilidad genética, además están asociados a presentaciones clínicas más variables como factores de virulencia o en la susceptibilidad a los agentes terapéuticos. (Andrade, Ferreira, Silva, & Pedrosa, 2010; Sanchini *et al.*, 2014)

Empleando la toma de huellas digitales por PCR M13 se ejecutaron estudios de caracterización molecular de 166 aislamientos criptocócicos clínicos recuperados en 6 hospitales de México, detectando 8 tipos moleculares correspondientes al complejo de *C. neoformans/C. gattii* de los cuales VNI fue el genotipo más común (124 casos, 74,6%), seguido de VNII (15 casos, 9%), VNIII (8 casos, 4,8%), VNIV (6 casos, 3,6%), VGI (6 casos, 3,6%), VGII (3 casos, 1,8%) y VGIII y VGIV (2 casos, 1,2% cada uno). Los autores confirmaron la presencia de *C. gattii* en aislados clínicos en el noreste de México y una alta variabilidad clonal en las cepas estudiadas de especies del complejo *C. neoformans / C. gattii* (González *et al.*, 2016).

En un estudio de genotipificación de *C. neoformans* y *C. gattii* aislados en México, evaluaron 72 aislamientos clínicos de pacientes con criptococosis y SIDA. La investigación reveló que 55 aislamientos correspondieron al genotipo VNI, cinco al genotipo VNII, tres a VNIII, uno a VNIV, dos a VGI, dos a VGII, dos a VGIII y dos al genotipo VGIV. Los resultados evidencian que la mayoría de los casos de criptococosis en México están relacionados con el SIDA y son causados por *C. neoformans* var. *grubii*, genotipos VNI y VNII (Castañón *et al.*, 2009).

De Aguiar *et al.*, (2017) en su investigación relacionada con la epidemiología de la Criptococosis y la caracterización de *C. neoformans* aislados en Brasil, concluyeron que la meningoencefalitis fue la manifestación más frecuente en 75% de los 41 pacientes evaluados, en los que 21 (51%) fueron aislados de LCR, 8 (19%) de hemocultivos, 10 (24%) de LCR y hemocultivos, uno (3%) de secreción de lesiones cutáneas y uno (3%) de lavado broncoalveolar. Todos los aislamientos presentaron apareamiento tipo MAT α y al realizar el perfil molecular por RFLP de los genes URA5 la mayoría correspondieron

al genotipo VNI de *C. neoformans* var. *grubii* (97%) y un solo aislamiento fue del genotipo VGI de *C. gattii*.

Mientras en Corea, de 46 aislamientos todos correspondieron a *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A, tipo de apareamiento MAT α y tipo molecular VNI. Sin embargo al realizar el análisis de secuenciación multilocus (MLST) identificaron 44 cepas (95, 7%) ST5 y 2 como ST31 concluyendo que los genotipos VNI/ST5 son genéticamente homogéneas (Park *et al.*, 2014). Por lo tanto en el diagnóstico molecular de meningitis criptocócica en muestras de LCR también ha sido empleados los cebadores CN4-CN5 que amplifica una secuencia de 136 pb de una región codificante de un gen específico para el ADNr de *C. neoformans* siendo altamente sensibles para la identificación de especies del complejo *C. neoformans/C. gattii*, en tal contexto evaluaron 165 muestras de las cuales 96 correspondieron a pacientes VIH con meningitis criptocócica y un grupo control de 69 pacientes con otras enfermedades neurológicas llegando a determinar que los cebadores CN4-CN5 fueron positivo en todas las cepas estándar de *Cryptococcus* y en 94,8% en muestras provenientes de pacientes con SIDA con meningitis criptocócica (Martins *et al.*, 2015).

La evaluación de características moleculares de 83 aislamientos de especies del complejo *C. neoformans/C. gattii*, han sido comparados con la finalidad de genotipificar estas cepas usando las técnicas de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del gen URA5 (URA5-RFLP), tipificación de secuencias multilocus (MLST) y reacción en cadena de la polimerasa repetitiva automatizada (rep-pcr; sistema diversilab), existiendo una buena correlación entre los tres métodos, aunque los híbridos AD no pudieron ser procesados por MLST pero si por el sistema diversilab. Además el tipo de secuencia (ST) MLST más común fue el ST5, representando el 91.6% (76/83), seguido de ST31, ST63, ST182, ST295, ST296 y ST332. ST295, ST296 y ST332 fueron nuevos (Dou *et al.*, 2014).

Un análisis también por MLST de 51 aislamientos clínicos de *C. neoformans* en Tailandia identificaron 5 ST, de los cuales identificaron 23 ST4 (45,1%), 18 ST6 (35.2%), 8 ST5 (15.6%), 1ST32 (1.9%) y 1 ST93 (1.9%) siendo el ST5 el que más encontraron en pacientes VIH (Hatthakaroon *et al.*, 2017). De 43 cepas analizados por MLST demostraron que 41 aislamientos de *C. neoformans* fueron genéticamente homogéneos y

el clon epidémico fue el ST5. Los dos correspondieron a *C. gattii* identificados como ST44 y ST159 (Wgu, Lei, Kang, Xiao, & Chen, 2015).

La secuencia de nucleótidos del gen 26S rRNA de los aislados representativos mostró alta homología con secuencias de especies de *Cryptococcus*. Las magnitudes se caracterizaron genéticamente utilizando los cebadores ERIC- PCR y REP-PCR , el análisis de conglomerados se realizó utilizando el programa NTSYS, los resultados mostraron la existencia de una variabilidad genética significativa, por lo tanto la variación de los aislados con marcadores moleculares REP-PCR se han utilizado para determinar la genética de la levadura. Se han utilizado comparaciones de huellas dactilares genéticas haciendo uso de los mismos marcadores (Dehghan & Rahimian, 2016).

En Australia la concordancia genética entre la mayoría de los aislamientos de infecciones humanas sigue siendo circunstancial. Se han desarrollado previamente a través del análisis de huellas digitales, empleando la técnica de ADN polimórfico (RAPD) utilizando marcadores arbitrarios de 12 a 22-meros en pares, que distingue claramente entre las dos variedades de *C. neoformans* y entre los tipos serológicos de *var. neoformans*. Los resultados indican que el análisis RAPD es un método sensible y útil para la investigación de la infección humana con este biotipo. La técnica en la que los cebadores individuales específicos con microsatélites o ADN minisatélite se utilizan para amplificar secuencias de ADN genómico. Este método fue utilizado para confirmar la sensibilidad de la técnica RAPD utilizado en este estudio (Sorrell *et al.*, 1996).

Asimismo en Italia de 2078 muestras. El porcentaje positivas fue similar entre ambos arbóreas y animales, 4,2% frente a 5,1% para *C. neoformans* 0,6% vs 1,4% para *C. gattii*. No es sorprendente que el tipo molecular prevalente entre los aislados clínicos y medio ambiente era VNI, y representaba una alta variabilidad genotípica. Además, una comparación de los resultados de los animales con los obtenidos a partir de muestras arbóreas reveló que los dos *Cryptococcus* complejos de especies se distribuyen por igual en plantas y animales, es probable que los árboles actúen como depósitos y la segunda como vectores para la propagación del medio ambiente (Montagna *et al.*, 2018).

En Perú, la mayoría de los pacientes con VIH, se concentra en el grupo de hombres que tienen sexo con hombres, sin embargo, la incidencia está aumentando en heterosexuales. En 2000-2010, la prevalencia de pacientes VIH positivos tratados con criptococosis fue del 14% en el Hospital Nacional Dos de Mayo (uno de los más grandes del país), siendo la neurocriptococosis, la manifestación más frecuente. La incidencia de neurocriptococosis en pacientes infectados por VIH, todavía representar un problema de salud pública. Del mismo modo se caracterizaron molecularmente 32 cepas de *Cryptococcus spp.* 23 cepas fueron aislados de pacientes infectados con el VIH y un individuo inmunocompetente además 8 cepas de muestras ambientales. Usando la huella digital de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP). Se observó dos variedades *C. neoformans* var. *grubii* (genotipo AFLP1 y AFLP1B) y *C. neoformans* var. *neoformans* (genotipo AFLP2), fueron las únicas especies criptocócicas involucradas en Infecciones humanas en Lima (Bejar *et al.*, 2014).

Las variedades *Grubii* y *neoformans* son más comunes en pacientes con VIH, su habitat se encuentra en la excreta de palomas y árboles de eucalipto, en lo concerniente a *C. gattii* es más común en pacientes inmunocompetentes su hábitat natural es más amplio y se ha aislado de detritos, flores y oquedades de numerosos árboles, entre ellos eucaliptos, acacias, ficus y almendros (Gómez Arias & Zarco Montero, 2011).

2. BASES TEÓRICAS

C. neoformans es una levadura oportunista que afecta a pacientes con alguna enfermedad de base o en aquellos que presentan una alteración en su respuesta inmune celular haciéndoles susceptibles a desarrollar la enfermedad (Restrepo, 2013) pero también a la capacidad patogénica asociada a múltiples factores de virulencia como la cápsula, proteínas enzimáticas, producción de melanina y a su capacidad de adherencia siendo la meningitis criptocócica la más frecuente y la máxima expresión del neurotropismo de esta levadura, dicha migración se debería a la secreción de la enzima ureasa que actúa debilitando la pared vascular endotelial y con ello atravesar la barrera hematoencefálica (Almeida *et al.*, 2015; May *et al.*, 2016).

Por otro lado la cápsula rica en glucorono-xilomanano impide la fagocitosis y estimula la supresión de células T inhibiendo la producción de citosinas como el interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) necesarios en la respuesta celular; mientras que la manipulación inmune de la levadura amortigua la inflamación, evita la muerte de las células fagocíticas y en última instancia migra al Sistema Nervioso Central, siendo el LCR un medio privilegiado debido a la ausencia de factores inhibidores de crecimiento y a la capacidad del *Cryptococcus* a ser metabólicamente más activo donde la síntesis y el tamaño de su cápsula se correlaciona con la gravedad clínica del paciente (Jarvis *et al.*, 2013).

La meningitis criptocócica es una infección del sistema nervioso central causado por el hongo levaduriforme *C. neoformans* siendo el sitio inicial de la infección el pulmón, puede difundir vía hematógena al cerebro, meninges y otros órganos (Bello *et al.*, 2013). La manifestación clínica más común es la cefalea y la convulsión, debido a la presión intracraneal que en niveles elevados suele causar ocasionalmente parálisis de los nervios craneales (Sloan & Parris, 2014) donde la meningitis criptocócica tiene alta mortalidad en pacientes VIH (Bahr & Boulware, 2014; Sánchez *et al.*, 2017).

La tipificación molecular es una herramienta molecular aplicada al estudio de la diversidad genética de un microorganismo y permite agrupar a sus miembros según su especie, por tanto conocer la huella digital es de importancia en la vigilancia de patógenos oportunistas entre ellos el *C. neoformans*, levadura que ha adquirido un gran interés en los últimos años debido al creciente número de pacientes inmunosuprimidos, para realizar estudios epidemiológicos y genéticos se han empleado diferentes técnicas de tipificación molecular, las cuales han demostrado un alto poder discriminatorio al agrupar los aislamientos en diferentes patrones moleculares (Escandón & Montilla, 2010).

La PCR emplea marcadores arbitrarios (AP-PCR) y la PCR que usa marcadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (rep-PCR), son las técnicas de PCR más utilizadas para tipificar bacterias y hongos. Estas son sencillas de realizar, rápidas y poseen un elevado poder de discriminación. La AP-PCR es relativamente poco reproducible, por lo que tiene que ser validada o estandarizada en cada laboratorio.

La digestión con enzimas de restricción de genes amplificados mediante PCR constituye la base de la PCR-RFLP. Esta técnica es sencilla y muy reproducible, pero suele ser menos discriminativa que la AP-PCR o la rep-PCR.

El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se basa en la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN obtenidos por restricción enzimática del ADN cromosómico. Esta técnica de tipificación posee mayor poder de discriminación y reproducibilidad que las anteriores, pero es más laboriosa, más costosa y requiere personal especializado. La rep-PCR es una técnica de tipificación en la que utilizan marcadores que hibridan secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacteriaceas y algunas bacterias Gram positivas y hongos. Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacteriaceas (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos (Fernandez, 2004).

Usando las técnicas moleculares de ERIC Y REP ha sido posible, discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie, y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, ya que poseen un gran poder discriminatorio (Rivas, Redondo y Alonso, 2006). Estas técnicas resultan sumamente sencillas, no dependen del uso de enzimas de restricción, ni de técnicas electroforéticas especiales, son rápidas, de relativo bajo costo, fáciles de analizar y de excelente reproducibilidad; todo lo cual las coloca en una posición privilegiada a la hora de seleccionar una técnica de tipificación genética. Sin embargo, suelen tener una menor versatilidad y un poder de resolución menor que el PFGE (Vílchez & Alonso, 2009).

CAPITULO II. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Micología y el Laboratorio de Biología Molecular del Área de Investigación del Hospital Regional Lambayeque durante enero del 2018 a marzo del 2019.

1. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

Es un estudio de tipo observacional, prospectivo y transversal (Argimón y Jiménez, 2004).

2. Población y Muestra

La población y muestra estuvo constituida por todas las cepas de *C. neoformans* aisladas de pacientes VIH positivo entre los años 2013 al 2018 en el Hospital Regional Lambayeque, Constituyendo un total de 19 cepas.

3. Técnica e instrumentos de recolección de datos

La técnica fue la observación y los instrumentos utilizados fueron los cuadernos de registro del laboratorio de Microbiología.

4. Procedimiento General

4.1. Reactivación de cepas de *C. neoformans*.

Las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de investigación del Hospital Regional Lambayeque, aisladas de Líquido cefalorraquídeo, conservados en el laboratorio de Investigación, área de Micología. Las mismas que fueron identificadas por equipos automatizados de Microscan y Vitek.

Cada cepa fue reactivada en 5 ml de BHI (CALDO cerebro- corazón) durante 24 horas, sin embargo seis no fueron viables, por lo tanto se las extrajo directamente del agar Sabouraud, luego fueron aisladas en placas y tubos conteniendo el mismo agar (Figura. 1).

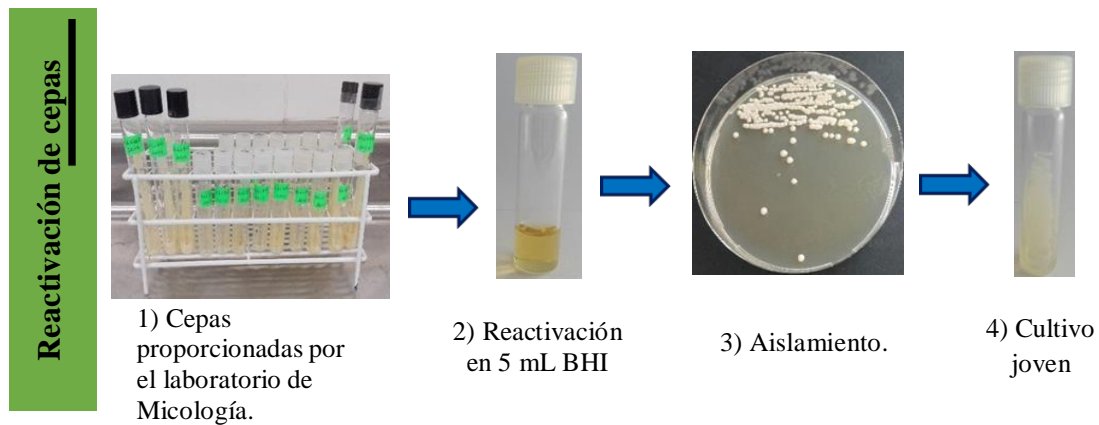


Figura 1. Reactivación de cepas de *C. neoformans* aisladas de pacientes VIH

4.2. Caracterización molecular de cepas de *Cryptococcus neoformans* mediante ERIC-PCR y REP-PCR.(Dehghan & Rahimian, 2016).

La variabilidad genética de *C. neoformans* aislado de pacientes con VIH del Hospital Regional Lambayeque con meningitis criptococócica fue evaluada mediante los marcadores moleculares ERIC-PCR y REP-PCR.

Extracción y purificación de ADN genómico.

La extracción de ADN para las cepas de *C. neoformans*, se basó en el método de Kit Invitrogen (Invitrogen, 2012) se utilizaron perlas de vidrio (Cidiane *et al.*, 2016; Sanchini *et al.*, 2014). Obteniendo el aislamiento eficaz del ADN.

Procedimiento:

- Los inóculos de cada cepa fueron preparados utilizando el DensiCHEK™ Plus para obtener la misma cantidad de ADN extraído. Primero se colocó a cero el instrumento usando el estándar 0.0 de McFarland (blanco), el instrumento muestra una serie de guiones seguidos de una lectura de McFarland (McF), Cada inóculo contenían 1 ml de agua destilada, se consideró una turbidez adecuada de 0,8 de la escala de McF.
- Cada suspensión fue transferida a un criovial de eppendorf de 1.5mL para ser centrifugada a 13000 rpm por 3 minutos.

- Se agregó 200 uL del tampón de digestión genómico al pellet obtenido y se procedió a homogenizar con ayuda del vórtex durante 2 minutos
- La suspensión fue transferido a un nuevo criovial de 1.5 mL el mismo que contenía perlas de vidrio esteriles de 0,25mm y 20 uL de proteínasa K, y se homogenizaron por 2 minutos.
- El criovial fue incubado en baño María a 55°C durante 3 horas y cada 10 minutos se homogenizo en el vórtex.
- Transcurrido las 3 horas de incubación se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos.
- Posteriormente se recuperó la fase acuosa (sobrenadante) y se colocó en un criovial eppendorf de 1.5 mL, más 20 uL de ARNasa y se homogenizo durante 20 segundos.
- Luego se agregó 200 uL de tampón de lisis genómico se homogenizo y se incubó a baño María a 55° C durante 10 minutos.
- Culminado el tiempo nuevamente se homogenizo y se agregó 200 uL de alcohol al 96 % y finalmente se realizó un vórtice.
- La suspensión fue transferido en un tubo de sílice y luego se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos.
- El tubo de sílice se colocó en un nuevo soporte colector y se agregó 500 uL tampón de lavado genómico “1”, y luego se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos.
- Nuevamente el tubo de sílice se colocó en un nuevo soporte colector y se agregó 500 uL lavado genómico “2” y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos.
- Por último el tubo de sílice se colocó en un criovial eppendorf de 1.5 mL y se agregó 40 uL de tampón genómico de elución y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos y posteriormente se descartó el tubo de sílice y el ADN obtenido se conservó 4°C (Figura 2).

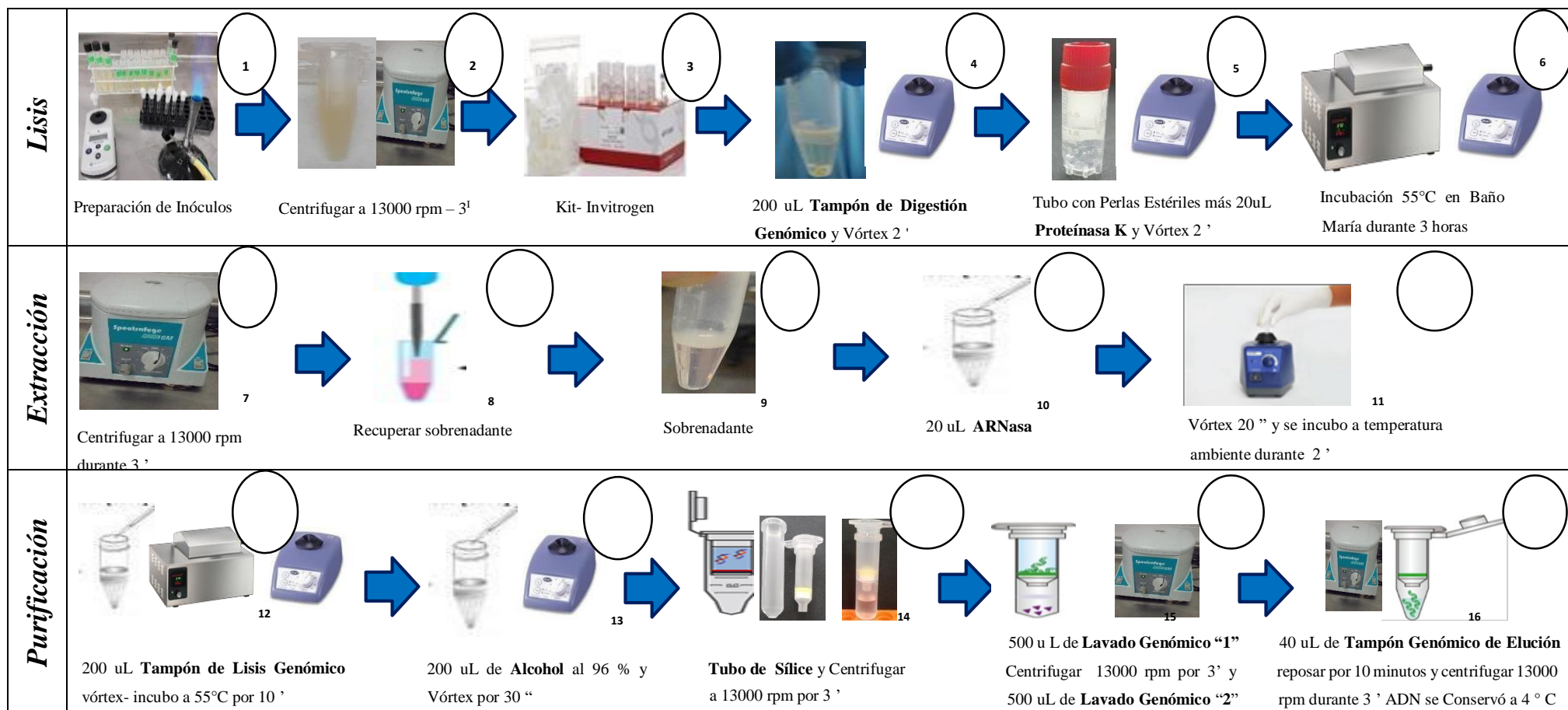


Figura 2. Lisis, extracción y purificación de ADN *Cryptococcus neoformans* ((Invitrogen, 2012).

Amplificación de ADN

Se realizaron las amplificaciones para ERIC-PCR y REP-PCR, utilizando las muestras de ADN de *C. neoformans*. Adicionalmente, se consideró una cepa ATCC (American Type Culture Collection) correspondiente a *Candida albicans* como outgroup o grupo externo. Se realizó tres repeticiones para cada técnica dependiendo de la repetitividad del patrón de bandas obtenido, haciendo un total de 60 reacciones.

Técnica ERIC-PCR.

Se emplearon los marcadores ERIC 1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA-3') y ERIC 2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGA GCG-3') conforme a lo reportado por (Versalovic, Koeuth, Lupski, & Plaza, 1991) y se preparó un mix PCR (anexo 6 y anexo 7), posteriormente se repartió a cada tubo de PCR 9,5 µL del mix y se agregó 3 µL de ADN generando un volumen total de 12.5 uL correspondiente a cada muestra, luego se mezcló bien para una buena reacción. Posteriormente se realizó un spin out de 5 segundos antes de colocar las reacciones al termociclador.

Las condiciones de ciclaje estuvieron conformados por la fase de desnaturalización inicial a 94 °C por siete minutos seguida por 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, hibridación o annealing con 38° C por un minuto y extensión a 72 °C por cinco minutos, luego un ciclo de extensión final a 72 °C por siete minutos (Figura 3).

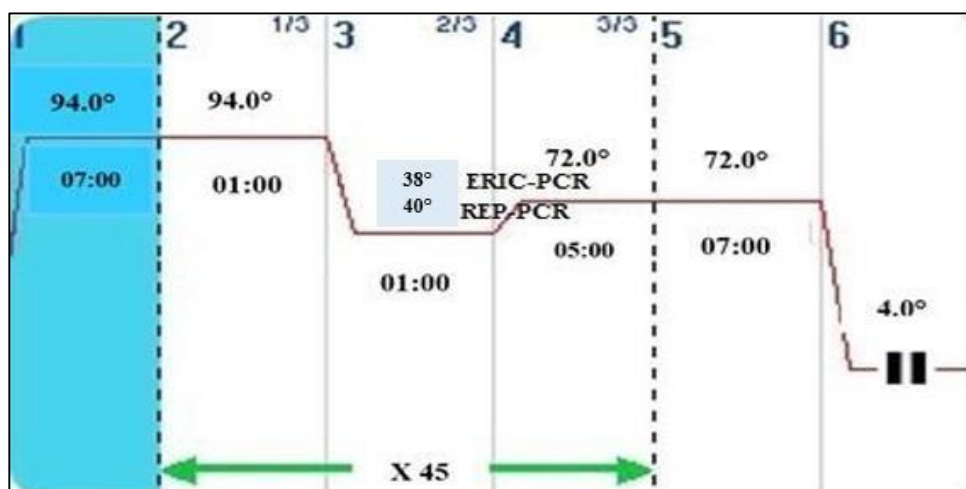


Figura 3. Condiciones termodinámicas de las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR programada en el termociclador Eppendorf.

Técnica REP – PCR

Se trabajaron con los marcadores de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP): REP 1R-Forward (5'- III ICG ICG ICA TCI GGC-3') y REP 2-I Reverse (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3') y se consideraron las mismas especificaciones de preparación del mix PCR y las condiciones de ciclaje mencionadas en las técnicas de ERIC -PCR, con la diferencia para este último solo se consideró la temperatura de annealing a 40°C (Figura 3).

Electroforesis

Los productos amplificados con los marcadores moleculares ERIC-PCR y REP-PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2%, utilizando buffer TAE 1X. En cada posillo del gel se colocaron 12.5 uL de muestra de PCR mezclados con 1 µL de loading buffer Dye en un gel con 15 pocillos. Adicionalmente, se colocó en el primero y último pocillo 2 µL del marcador de peso molecular de 100 pb del fago λ. La corrida electroforética se realizó a condiciones de: Pre-corrida de 70V por 10 minutos, corrida de 110 V por 70 minutos y post-corrida de 70V por 10. Posteriormente los geles fueron teñidos durante 7 minutos en una solución que contenía 0.5 mg/mL de bromuro de etidio.

Fotodocumentación.

Los geles se fotografiaron con el scanner molecular PHAROS FX Plus, fueron visualizados y registrados con el software *Quantity one* BIORAD.

4.3. Análisis y procesamiento de datos

Los productos amplificados de *C. neoformans* producidos con los marcadores moleculares ERIC-PCR y REP-PCR se estudiaron aplicando el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA), utilizando el paquete estadístico del software Quantity One® BIORAD; asimismo, la posición de bandas se normalizó con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

4.3.1. Matriz binaria

Se realizó el bandeo o scoring a los perfiles electroforéticos, generados producto de la amplificación mediante ERIC-PCR y REP-PCR, de esta manera se lograron registrar los patrones de bandas obtenidas de cada cepa y para ambos marcadores moleculares, a partir de esto se armó una matriz binaria o matriz de presencia y ausencia, así la presencia de una banda en una cepa era expresada como uno y su ausencia como cero, donde las filas correspondieron a los caracteres y las columnas a las cepas. Estas se detectaron con una tolerancia de 1.4%. La información se ingresó en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2013 (anexo 10 y 11).

4.3.2. Matriz de similitud

Se calculó la similitud entre cada par de cepas, basándose en las diferencias cualitativas de presencia o ausencia de bandas obtenidas de la matriz binaria. En este cálculo de comparación entre dos cepas se pueden dar las siguientes cuatro posibilidades: Coincidencia del carácter de presencia de banda en ambas cepas (1,1), presencia en la primera cepa y no en la segunda (1,0), ausencia en la primera cepa y no en la segunda (0,1) y coincidencia de ausencias en ambas cepas (0,0) (Serquén, 2011).

A partir de la matriz binaria y utilizando coeficiente DICE se obtuvo una matriz de similitud. DICE es uno de los más apropiados para este análisis, debido a que le da más importancia a las bandas presentes en ambos individuos. DICE, 1945; Nei y Lei, 1979 (Castañón, Ramírez, Ruiz, & Mayek, 2011).

$$DICE = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Donde:

a: Número de bandas presentes en ambas cepas,

b: Número de bandas presentes en la primera cepa, pero no en la segunda,

c: Número de bandas presentes en la segunda cepa pero no en la primera.

De esta manera se generó la matriz de similitud (anexo 12 y 13).

4.3.3. Elaboración del dendrograma

A partir de la matriz de similitud, mediante el algoritmo de agrupamiento jerárquico conocido como UPGMA (método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética), que une las cepas en grupos similares obteniendo el dendrograma.

4.3.4. Clasificación de los agrupamientos y determinación de las categorías genéticas.

La determinación del punto de corte fue según la concordancia de la agrupación que se obtuvo para cada técnica de genotipaje y a partir de este se definieron los patrones. Posteriormente, se consideraron las categorías genéticas según los criterios por (Tenover *et al.*, 1995) de esta forma las cepas fueron consideradas:

- Cepas genéticamente idénticas: con el mismo número de bandas.
- Cepas indistinguibles: Aquellas que presentan de 0 a 1 de diferencias.
- Cepas estrechamente relacionadas: aquellas que difirieron en dos o tres bandas.
- Cepas posiblemente relacionadas: presentaron de cuatro a seis bandas distintas.
- Cepas sin relación alguna: difirieron en más de siete bandas.

4.3.5. Determinación de los valores descriptivos

Para demostrar la utilidad y confiabilidad de los marcadores moleculares, en este estudio se calculó el poder discriminatorio y el coeficiente de correlación cofenético.

4.3.5.1. Poder discriminatorio

Según los datos obtenidos de los dendrogramas ERIC PCR, REP PCR se calculó el poder de discriminación (ID). Este se cuantificó con el índice de diversidad de (Coll, Coque, Angeles, Vazquez, & Vila, 2005) considerando que el número de discriminación ideal es 1.0.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1) \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)}$$

Donde:

N= n° de cepas; S=n° tipos distintos; nj= n° cepas pertenecientes al tipo J.

4.3.5.2. Coeficiente de correlación cofenético o Test de Mantel

El agrupamiento de las cepas puede generar distorsiones en el dendrograma respecto a los datos de similitud originales. La cuantificación de dicha distorsión se realizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación cofenético por el test Mantel, que consiste en correlacionar la matriz de similitud original con una matriz cofenético, que surge de las similitudes observadas entre los pares de cepas comparadas, dando un valor entre 0 y 1, donde 1 representa una combinación perfecta (Serquén, 2011).

Esto permitió realizar una validación interna, con la finalidad de comprobar el nivel de confianza de la matriz de similitud y la fidelidad del dendrograma. Esto se determinó utilizando la plataforma virtual de García y Puigbo (2010).

4.4. Consideraciones éticas.

Conforme al Comité de ética en investigación del HRL, el hospital brindó la factibilidad de las áreas involucradas el uso de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes VIH positivo.

CAPITULO III. RESULTADOS

En este estudio se trabajó con 19 cepas correspondiente a *C. neoformans* de muestras de Líquido Cefalorraquídeo de pacientes VIH positivo y fueron evaluadas mediante la técnica de ERIC-PCR y REP- PCR.

1. Caracterización molecular

El cálculo del coeficiente de correlación cofenético para los dos dendrogramas de cada técnica y el consenso de ambos arrojó un valor de 0,88 y 0,89. Además el poder de discriminación para los dos casos fue de 0,99, generaron un alto grado de confiabilidad para la diferenciación de todas las cepas de *C. neoformans*.

Los productos amplificados mediante la técnica ERIC-PCR en cada perfil (*fingerprints* o electroferotipo) oscilaron entre 5 a 20 bandas. Además con un punto de corte al 0,85 generaron 10 patrones, integrados por cinco genotipos únicos conformadas por **P1, P6, P7, P8, P10** y cinco patrones **P2, P3, P4, P5, P9**, cuyas similitudes genéticas mostraron de 0.85 al 0.91.

El patrón **P2** se distribuyó en dos sub patrones de ellos el Cry 214 y Cry 228 se discriminaron como cepas indistinguibles. Presentaron una similitud de 0.95 y Cry 14 como cepa estrechamente relacionada con 0.84 de similitud genética.

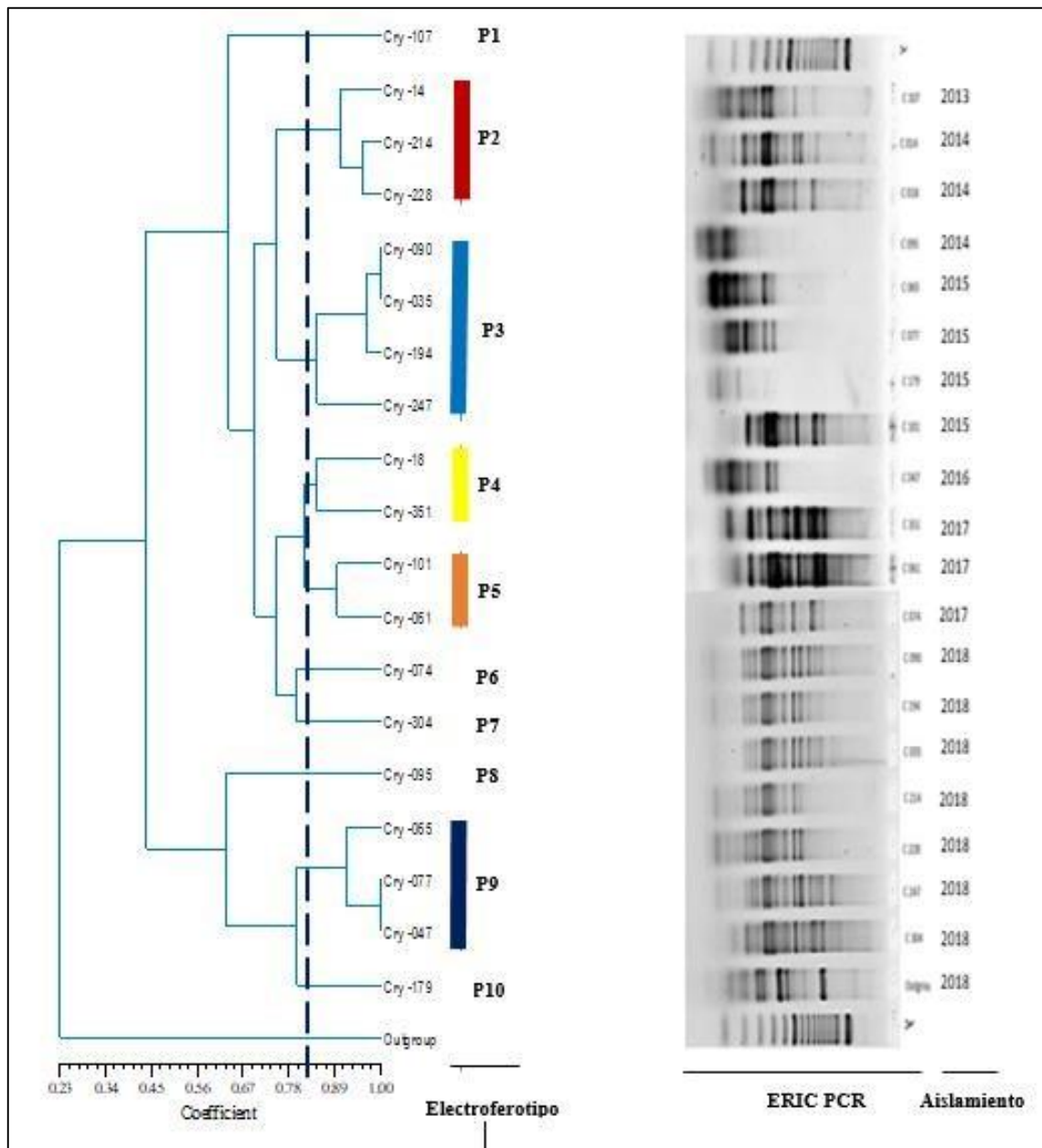
El patrón **P3** lo conformaron tres sub patrones, las cuales Cry 090 y Cry 035 mostraron semejanzas en el 100% de las bandas y se discriminaron como cepas genéticamente idénticas, con una similitud de 1.00, las dos cepas restantes Cry 194 y Cry 247 fueron discriminadas como cepas posiblemente relacionadas, cuyas similitud genética dieron 0.97 y 0.84. Por otro lado el patrón **P4** lo integraron cepas idénticas con un 0.84 de similitud y el patrón **P5** lo conformaron cepas indistinguibles con 0.89 de similitud genética.

El patrón **P9** lo integraron dos sub patrones, de ellas Cry 077 y Cry 047 mostraron semejanzas en el 100% de las bandas y se discriminaron como cepas genéticamente idénticas con 1.00 de similaridad, la cepa Cry 0.65 se discriminó como cepa indistinguible con 0.91 de similitud genética (Tabla 1 y Figura. 4).

Tabla 1. Patrones de caracterización molecular mediante ERIC -PCR de cepas de *C. neoformans* aisladas de pacientes VIH positivo. Hospital Regional Lambayeque. Enero 2018 – Marzo 2019.

Patrón	Nº de cepas	Aislamiento	Categoría	Valor de similitud
P1	1	Cry 107	No relacionado	0.62
P2	3	Cry 14	Estrechamente relacionado	0.84
		Cry 214	Cepas indistinguibles	0.95
		Cry 228		
		Cry 090	Genéticamente idénticos	1.00
		Cry 035		
P3	4	Cry 194	Cepas indistinguibles	0.97
		Cry 247	Posiblemente relacionados	0.84
P4	2	Cry 18	Genéticamente idénticos	0.84
		Cry 351		
P5	2	Cry 101	Cepas indistinguibles	0.89
		Cry 061		
P6	1	Cry 074	No relacionado	0.80
P7	1	Cry 304	No relacionado	0.80
P8	1	Cry 095	No relacionado	0.62
		Cry 065	Cepas indistinguibles	0.91
P9	3	Cry077	Genéticamente idénticos	1.00
		Cry047		
P10	1	Cry 170	No relacionado	0.80

P: Patrón, Cry: *C. neoformans*



P: Patrón, Cry: *C. neoformans*

Figura 4. Dendrograma según ERIC-PCR de 19 cepas de *C. neoformans* generado por UPGMA. (La escala inferior corresponde a la similaridad entre aislados basada en el coeficiente de DICE).

Asimismo por la técnica de REP-PCR, se obtuvieron 4 a 16 bandas por perfil electroforético. Se consideró un punto de corte al 0.67, generando 12 patrones constituido por nueve genotipos únicos conformados por **P1, P4, P5, P7, P8, P9, P10, P11, P12** y tres patrones **P2, P3, P6**. Las similitudes genéticas oscilaron del 0.67 al 0.70. El patrón **P2** integro cepas genéticamente idénticas con 0.73 de similitud genética.

El patrón **P3** se distribuyó en 3 subpatrones de ellas Cry 090 y Cry 194 y se discriminaron como cepas genéticamente idénticas con 0.82 de similaridad, mientras que Cry 194 se discrimino igual que la anterior con la diferencia de 0.97 de similitud genética y Cry 247 como posiblemente relacionada, con 0.84 de similitud. Además el patrón **P6** presento dos subpatrones, las cepas Cry 0.61 y Cry 101 se discriminaron como estrechamente relacionadas y contaban con una similitud genética del 0.86 y Cry 018 como posiblemente relacionada con 0.67 de similitud genética. (Tabla 2 y Figura. 5).

Tabla 2. Patrones de caracterización molecular mediante REP -PCR de cepas de *C. neoformans* aisladas de pacientes VIH positivo. Hospital Regional Lambayeque. Enero 2018 – Marzo 2019.

Patrón	N° de cepas	Aislamiento	Categoría	Valor de similitud
P1	1	Cry 101	No relacionado	0.67
P2	2	Cry 74	Genéticamente idénticos	0.73
		Cry 090	Genéticamente idénticos	0.62
		Cry 194		
P3	4	Cry 35	Genéticamente idénticos	0.76
		Cry 247	Estrechamente relacionado	0.67
P4	1	C 014	No relacionado	0.67
P5	1	C 228	No relacionado	0.67
		Cry 018	Posiblemente relacionados	0.67
P6	3	Cry 061	Estrechamente relacionado	0.86
		Cry 101		
P7	1	Cry 047	No relacionado	0.67
P8	1	Cry 304	No relacionado	0.67
P9	1	Cry351	No relacionado	0.67
P10	1	Cry095	No relacionado	0.67
P11	1	Cry065	No relacionado	0.67
P12	1	Cry 77	No relacionado	0.67

P: Patrón, Cry: *C. neoformans*

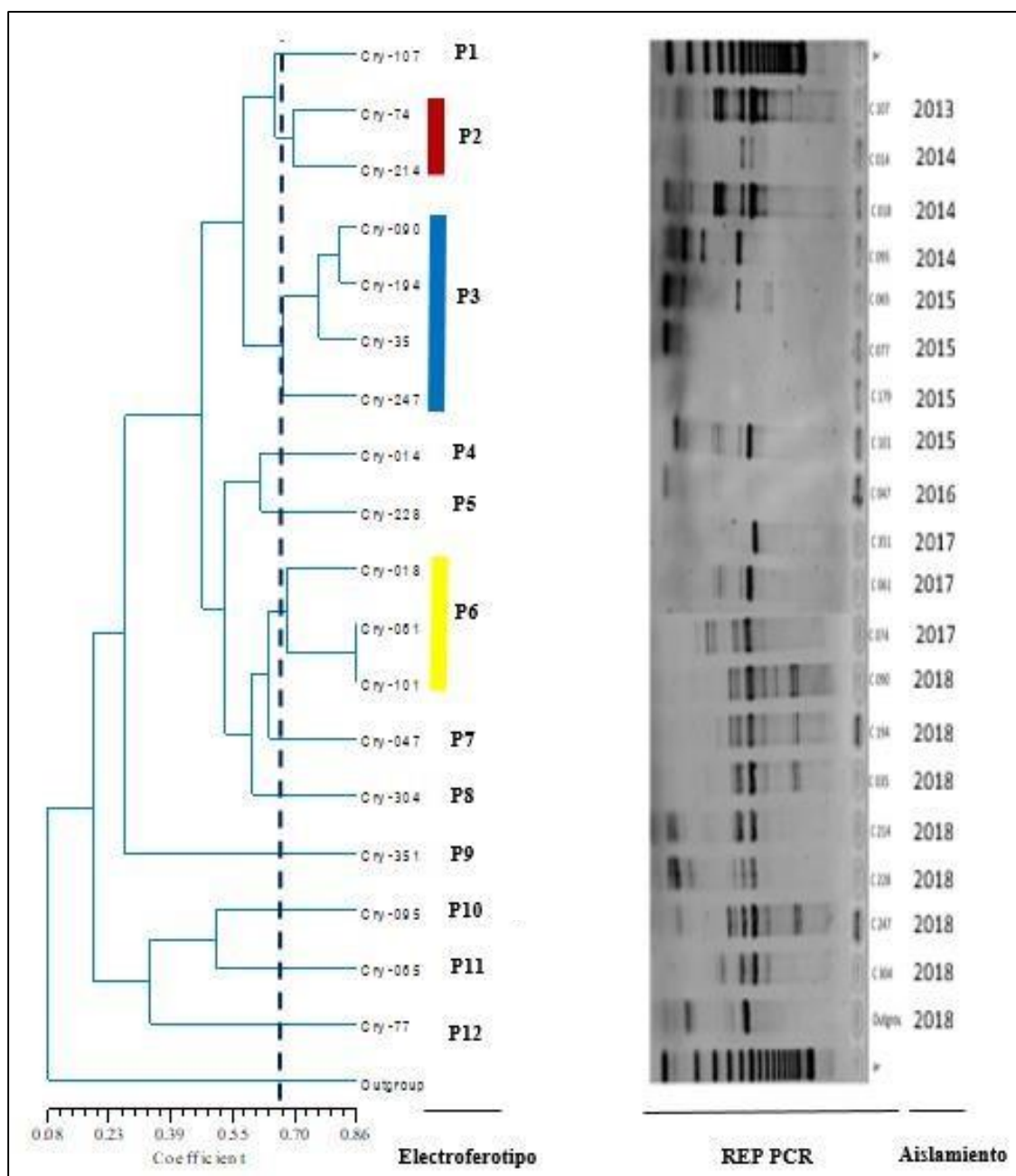


Figura 5. Dendrograma según REP - PCR de 19 cepas de *C. neoformans* generado por UPGMA. (La escala inferior corresponde a la similaridad entre aislados basada en el coeficiente de DICE)

1.1.Criterios de ERIC-PCR y REP-PCR.

Las cepas clasificadas como genéticamente idénticas, se puede asumir que estas derivaron de un ancestro común, y que poseen un nivel de similitud significativo. Las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR fueron capaces de discriminar como genéticamente idénticas a las cepas de *C. neoformans*, así en ERIC-PCR los patrones **P3, P4, P9** y **P2, P3**, mientras que en REP-PCR **P2, P3** mostrando semejanza entre sus bandas. Del mismo modo se discriminaron los demás aislamientos, clasificadas como indistinguibles, estrechamente y posiblemente relacionadas.

CAPITULO IV. DISCUSIÓN

La *criptococosis* es una micosis que compromete seriamente la vida de los pacientes, particularmente de individuos inmunosuprimidos, cuyas defensas disminuidas no pueden controlar a la levadura *Cryptococcus* aun cuando ésta no ha alcanzado la dosis infectiva; el impacto en la sociedad es alto debido a que la enfermedad no se notifica a las autoridades pertinentes, de ahí que no se conoce una real prevalencia. Por otro lado, por tener la levadura una distribución mundial, encontrarse en el ambiente y diseminarse por vía aerógena, en la mayoría de los casos los pacientes se contagian por inhalación llegando directamente al pulmón y de ahí por vía sanguínea al Sistema Nervioso Central causando las manifestaciones neurológicas graves; siendo la fuente más común de aislamiento de *Cryptococcus* el líquido cefalorraquídeo, coincidiéndose en este caso con la mayoría de autores, a la vez explica que todos los aislados estudiados en el presente estudio provienen de muestras de líquido cefalorraquídeo.

Las técnicas basadas en el análisis de regiones repetitivas del cromosoma como ERIC-PCR y REP-PCR tienen una amplia versatilidad para la caracterización molecular, siendo recomendable utilizar por lo menos dos marcadores de genotipificación diferentes, para lograr establecer con mayor eficacia las posibles relaciones entre cepas, tal y como lo admite Sánchez *et al.*, (2017) quien menciona la utilización de técnicas combinadas para la identificación micológica. Por otro lado, se registró un ID de 0,99 para ambos casos, indicando que tienen similar capacidad de discriminar un aislado de otro.

Los dendrogramas evidenciaron alta fiabilidad significativa por el test de mantel (0,89), indicando una buena representación de la relación genética de los aislamientos y una correcta topología del dendrograma. Así la determinación del punto de corte son recomendables una identidad de patrones (Coll *et al.*, 2005) y una coincidencia con respecto a las agrupaciones obtenidos por ambas técnicas, siendo considerados para ERIC-PCR y REP-PCR el 0,84 y 0,67 respectivamente. Dehghan & Rahimian, (2016), definieron un punto de corte similar (0,67), el cual es variable para cada estudio, dado

que este infiere directamente en los agrupamientos de los dendrogramas, tomando en cuenta el nivel de polimorfismo generado.

De esta manera, los resultados de ambas técnicas fueron concordantes al número de patrones (de 10 a 12). No obstante, en el presente estudio no se obtuvo ningún producto amplificado correspondiente a la cepa siete de REP- PCR, este fenómeno pudo deberse a la inhibición de la reacción de amplificación o a la cantidad insuficiente de material genético de la levadura. Resultados similares reportó Sánchez *et al.*, (2017) empleando RFLP de las cuales tres aislamientos no mostraron ningún producto amplificado de un total de 27 cepas. Este resultado abala la utilidad de estos procesos en la caracterización micológica, especialmente cuando se utiliza dos marcadores diferentes, debido a que en ERIC- PCR se obtuvo productos amplificados. Por el contrario Dou *et al.*, (2014) mediante la tipificación de secuencias multilocus (MLST) no pudieron ser procesados los híbridos AD, pero si por la reacción en cadena de la polimerasa repetitiva automatizada (rep-pcr; sistema diversilab).

En la investigación existe una variabilidad de patrones, que por haber sido discriminados con marcadores similares ponen en evidencia que los casos de criptococosis están relacionados con el VIH, y son causados por *C. neoformans*. Diversos investigadores mencionan haber tenido similares resultados, así Castañón *et al.*, (2009) en México precisaron que la criptococosis está relacionado con el SIDA y son causados por *C. neoformans* variedad *grubii*, genotipos VNI y VNII. Por otro lado, Sanchini *et al.*, (2014) reportó que los *C. neoformans var neoformans* de Asia y Europa mostraron mayor alelo y diversidad de nucleótidos en comparación con *C. neoformans var grubii*; mientras que Bejar *et al.*, (2014) en Lima informo diferentes genotipos en *C. neoformans var. grubii* (genotipo AFLP1 y AFLP1B) y *C. neoformans var. neoformans* (genotipo AFLP2).

Los aislamientos de muestras clínicas en comparación con muestras ambientales como árboles y excremento de aves presentan diferentes grados de heterogeneidad genética, es probable que los arboles actúen como depósitos y las aves como vectores para la propagación del medio ambiente. Según investigaciones por Montagna *et al.*, (2018) ha comprobado el tipo molecular prevalente es VNI entre los aislados clínicos versus los aislados del medio ambiente, este mismo genotipo han reportado diversos

autores durante los últimos años. Así, De Aguiar *et al.*, (2017) reportó en su investigación epidemiología de *C. neoformans* mediante el análisis RFLP de los genes URA5 la mayoría de los aislamientos (97.5%) correspondieron al genotipo VNI (serotipo A, *var. grubii*). De manera similar Park *et al.*, (2014) y Gonzales *et al.*, (2016), definieron el tipo molecular VNI considerando el agente causal más frecuente de la criptococosis en todo el mundo, mientras que VNII se distribuye globalmente, pero es rara.

Las técnicas de ERIC formaron diez patrones (P1- P10) y REP doce patrones (P1- P12) esta variabilidad genética se fundamenta en variaciones fenotípicas tales como los múltiples factores de virulencia o la susceptibilidad a los agentes terapéuticos, tal como lo describe Almeida *et al.*, 2015; May *et al.*, 2016 y Andrade *et al.*, (2010). Además, las características del huésped contribuyen a estas diferencias en las presentaciones de la enfermedad, el presente análisis está limitado por las características incompletas del paciente y una falta de seguimiento clínico, esta falta impidió el análisis del impacto pronóstico de los diferentes patrones en el resultado del paciente. Por otra parte las los diversos patrones varía de acuerdo a las áreas geográficas, tiempo y otros factores específicos (Castañón *et al.*, 2009).

Estas características, explicaría los diversos patrones formados por ambos iniciadores sumado a ello *C. neoformans var. neoformans* son genéticamente más heterogéneos que *C. neoformans var. grubii*, (Sanchini *et al.*, 2014). Datos parecidos obtuvo Park *et al.*, (2014) revela una mayor variabilidad genética en Corea encontrando alelos altamente polimórficos en los loci del gen MLST, por el contrario, en Asia una baja variabilidad genética. Se necesitan estudios adicionales utilizando diferentes métodos de tipado es decir, análisis de microsatélites y MLST, para explicar mejor dicha variabilidad genética.

Aunque no se usa en el diagnóstico de rutina, los métodos moleculares, se emplean para la detección de secuencias genéticas específicas del complejo de *C. neoformans*, partir de muestras clínicas como el LCR o cepas de cultivo. Estas herramientas brindan resultados más completos que el diagnóstico convencional y contribuye a una mejor comprensión a la historia natural del *Cryptococcus* permitiendo la identificación de *C. neoformans* y *C. gattii*; sin embargo en los últimos años *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus*, han empezado a aparecer con mayor frecuencia, siendo la

capacidad hemolítica de *C. laurentii* una característica propia que aumenta su capacidad patogénica y favorece el crecimiento en sangre, a diferencia de lo que ocurre con *C. neoformans*, generando impacto en la salud pública (Rodríguez & Pinilla, 2014).

El empleo de técnicas moleculares como ERIC-PCR y REP-PCR son útiles para caracterizar aislamientos clínicos y ambientales de acuerdo a su variabilidad genética. Realizar la vigilancia molecular es una herramienta epidemiológica de gran valor, teniendo en cuenta que la criptococosis adquirido en los últimos años un gran interés debido a la pandemia VIH y al creciente número de pacientes inmunosuprimidos. La mortalidad sigue siendo alta esto demuestra la gravedad de la enfermedad, a pesar del uso de un tratamiento específico. Siendo *C. neoformans* var. *grubii* (genotipo VNI y VNII) el principal agente etiológico razón que podría explicar las tasas de mortalidad van del 26% al 70% (De Aguiar *et al.*, 2017).

El estudio permite entender la variabilidad como un comienzo para establecer una red nacional de investigación. Asimismo, ampliar los conocimientos acerca de esta micosis y posibles brotes para el mejor manejo de los pacientes afectados.

CAPITULO V. CONCLUSIÓN

1. Las cepas de *C. neoformans* aisladas pacientes VIH positivo se caracterizaron molecularmente, revelando diez patrones en ERIC-PCR y doce patrones en REP-PCR.
2. Se observó una variabilidad genética significativa en las cepas de *C. neoformans*, generando un valor informativo, formando los patrones en ERIC (P1-P10) y en REP (P1- P12).
3. Los cebadores ERIC-PCR y REP-PCR mostraron ser eficientes en la caracterización de *C. neoformans*, revelando valores altos de discriminación y coeficientes de correlación cofenético.

CAPITULO VI. RECOMENDACIONES

1. Establecer estudios prospectivos que implementen reportes para determinar la presencia de *C. neoformans* en muestras clínicas y ambientales.
2. Confirmar los resultados obtenidos con procedimientos más discriminatorios y/o resolutivos como MLST o AFLP, que permitan la identificación de su variabilidad genética.
3. Analizar la secuencia genómica de las variedades de *C. neoformans* usando herramientas bioinformáticas para encontrar las diferencias entre los patrones.
4. Secuenciar los fragmentos generados por ERIC-PCR y REP-PCR de *C. neoformans*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, F., Wolf, J. M., & Casadevall, A. (2015). Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 14(12), 1173–1185. <https://doi.org/10.1128/ec.00103-15>
- Andrade, L., Ferreira, K., Silva, M. L., & Pedrosa, A. L. (2010). Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. *Fungal Biology*, 114(5–6), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.03.005>
- Argimon, J., & Jiménez, J. (2004). *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*.
- Bahr, N. C., & Boulware, D. R. (2014). Methods of rapid diagnosis for the etiology of meningitis in adults. *Biomarkers in Medicine*, 8(9), 1085–1103. <https://doi.org/10.2217/BMM.14.67>
- Bejar, V., Tello, M., García, R., Guevara, J. M., Gonzales, S., Vergaray, G., ... Gutierrez, E. L. (2014). Molecular characterization and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* strains collected from a single institution in Lima, Peru. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(2), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.01.005>
- Bello, Y. brum, Guapyassu, H., Freitas, J., Schettini, F., Martins, G., Dortas, S., ... Da Silva, A. M. (2013). Cryptococcal Meningitis in Immunocompetent Patient-Case Report. *American Medical Journal*, 4(1), 100–104. <https://doi.org/10.3844/amjsp.2013.100.104>
- Castañón, G., Ramírez, M., Ruiz, R., & Mayek, N. (2011). AFLP marker application to explore heterosis in *Capsicum* spp. *Phyton*, 80(1), 53–58.
- Castañón, L. ., Martínez, K. M., Bermúdez, R. ., Martínez, M. ., Meyer, W., Espinosa, R. A. A., ... Ruiz Palacios Y Santos, G. M. (2009). Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Medical Mycology*, 47(7), 713–721. <https://doi.org/10.3109/13693780802559031>
- Chan, M., Lye, D., Win, M. K., Chow, A., & Barkham, T. (2014). Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis in Singapore: Predominance of *Cryptococcus neoformans* compared with *Cryptococcus gattii*. *International Journal of Infectious Diseases*, 26, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.019>
- Cidiane, G. M., Rocha, F., Pereira, C. paulo, & Caligiorne, R. (2016). Use of Polymerase chain Reaction for *Cryptococcus neoformans* Genome Detection in Cerebrospinal Fluid for Neurocryptococcosis Diagnosis. *Medical Mycology: Open Access*, 2(2), 1–7. <https://doi.org/10.21767/2471-8521.100013>
- Cogliati, M. (2013). Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* : An Atlas of the Molecular Types . *Scientifica*, 2013(serotype

D), 1–23. <https://doi.org/10.1155/2013/675213>

- Coll, P., Coque, T., Angeles, M., Vazquez, J., & Vila, J. (2005). Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. In *Seimc.Org*. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>
- Contreras Mendoza, E. Y., Gonzalez Mendez, J. M., & De la Cruz Vargas, J. (2017). *Factores de riesgo asociados a la presencia de Criptococosis en pacientes hospitalizados en el Hospital HIPOLITO UNANUE 2010-2015 (Tesis de Pregrado)*.
- De Aguiar, P. A. D. F., Pedroso, R. D. S., Borges, A. S., Moreira, T. de A., De Araújo, L. B., & Röder, D. von D. de B. (2017). The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian university hospital. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59(February 2016). <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759013>
- Dehghan, N. M., & Rahimian, H. (2016). *Assessment of genetic diversity of yeast isolates causing canker in stone fruit trees in some central provinces of iran*. 2(52), 2–23.
- Dou, H. T., Xu, Y. C., Wang, H. Z., & Li, T. S. (2014). Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using multilocus sequence typing and the DiversiLab system. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(4), 753–762. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2289-2>
- Escandón, P., & Montilla, A. (2010). Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. *Infectio*, 14, 127–130. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(10\)70130-2](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(10)70130-2)
- Fernandez, F. (2004). *Applications of PCR techniques for molecular epidemiology of infectious diseases*. 22(6), 355–360.
- Gómez Arias, B., & Zarco Montero, L. A. (2011). Meningeal criptococcosis: clinical and laboratory characteristics. *Acta Neurológica Colombiana*, 27(1), 9–27.
- González, G. M., Casillas-Vega, N., Garza-González, E., Hernández-Bello, R., Rivera, G., Rodríguez, J. A., & Bocanegra-García, V. (2016). Molecular typing of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex from Northeast Mexico. *Folia Microbiologica*, 61(1), 51–56. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0409-8>
- Hatthakaroorn, C., Pharkjaksu, S., Chongtrakool, P., Suwannakarn, K., Kiratisin, P., & Ngamskulrungrroj, P. (2017). Molecular epidemiology of cryptococcal genotype VN1c/ST5 in Siriraj Hospital, Thailand. *PLoS ONE*, 12(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173744>
- Invitrogen. (2012). PureLink Plant Total DNA Purification Kit.
- Jarvis, J. N., Casazza, J. P., Stone, H. H., Meintjes, G., Lawn, S. D., Levitz, S. M., ... Koup, R. A. (2013). The phenotype of the *Cryptococcus*-specific CD4+ memory T-

- cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis. *Journal of Infectious Diseases*, 207(12), 1817–1828. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit099>
- Martins, M. dos A., Brighente, K. B. S., Matos, T. A., Vidal, J. E., Hipólito, D. D. C., & Pereira-Chiocola, V. L. (2015). Molecular diagnosis of cryptococcal meningitis in cerebrospinal fluid: Comparison of primer sets for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complex. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(1), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.09.004>
- May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T., & Nielsen, K. (2016). *Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 106–117. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>
- Montagna, M. T., De Donno, A., Caggiano, G., Serio, F., De Giglio, O., Bagordo, F., ... Cogliati, M. (2018). Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from environmental sources and genetic comparison with clinical isolates in Apulia, Italy. *Environmental Research*, 160(June 2017), 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.032>
- O'Meara, T. R., & Alspaugh, A. J. (2012). The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 387–408. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-12>
- Park, S. H., Kim, M., Joo, S. I., & Hwang, S. M. (2014). Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates in Seoul, Korea. *Mycobiology*, 42(1), 73–78. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.73>
- Restrepo, A. M. (2013). Las infecciones fúngicas invasoras: una amenaza creciente. *Infectio*, 16(Supl 3), 1–2. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(12\)70020-6](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(12)70020-6)
- Rodríguez, D., & Pinilla, A. (2014). Infección asociada a catéter central por *Cryptococcus laurentii* en niño críticamente enfermo: a propósito de un caso y revisión del tema. *Infectio*, 16(1), 72–74. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(12\)70059-0](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(12)70059-0)
- Sánchez, S., Zambrano, D., García, M., Bedoya, C., Fernández, C., & Illnait-Zaragozi, M. (2017). Caracterización molecular de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* de pacientes con HIV, Guayaquil, Ecuador. *Biomédica*, 37, 425–430.
- Sanchini, A., Smith, I. M. C., Sedlacek, L., Schwarz, R., Tintelnot, K., & Rickerts, V. (2014). Molecular typing of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected in Germany from 2004 to 2010. *Medical Microbiology and Immunology*, 203(5), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0341-6>
- Sloan, D. J., & Parris, V. (2014). Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. *Clinical Epidemiology*, 6(1), 169–182. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S38850>
- Sorrell, T. C., Chen, S. C. A., Ruma, P., Meyer, W., Pfeiffer, T. J., Ellis, D. H., & Brownlee, A. G. (1996). Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA

analysis and PCR fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1253–1260.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239.

Vidal, J. E., Penalva De Oliveira, A. C., Dauar, R. F., & Boulware, D. R. (2013). The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(3), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.020>

Wu, S., Lei, Y., Kang, M., Xiao, Y., & Chen, Z. (2015). *Molecular characterisation of clinical Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii isolates from Sichuan province, China* (pp. 280–287). pp. 280–287.

ANEXOS

ANEXO 1. Técnicas de ERIC-PCR y REP-PCR

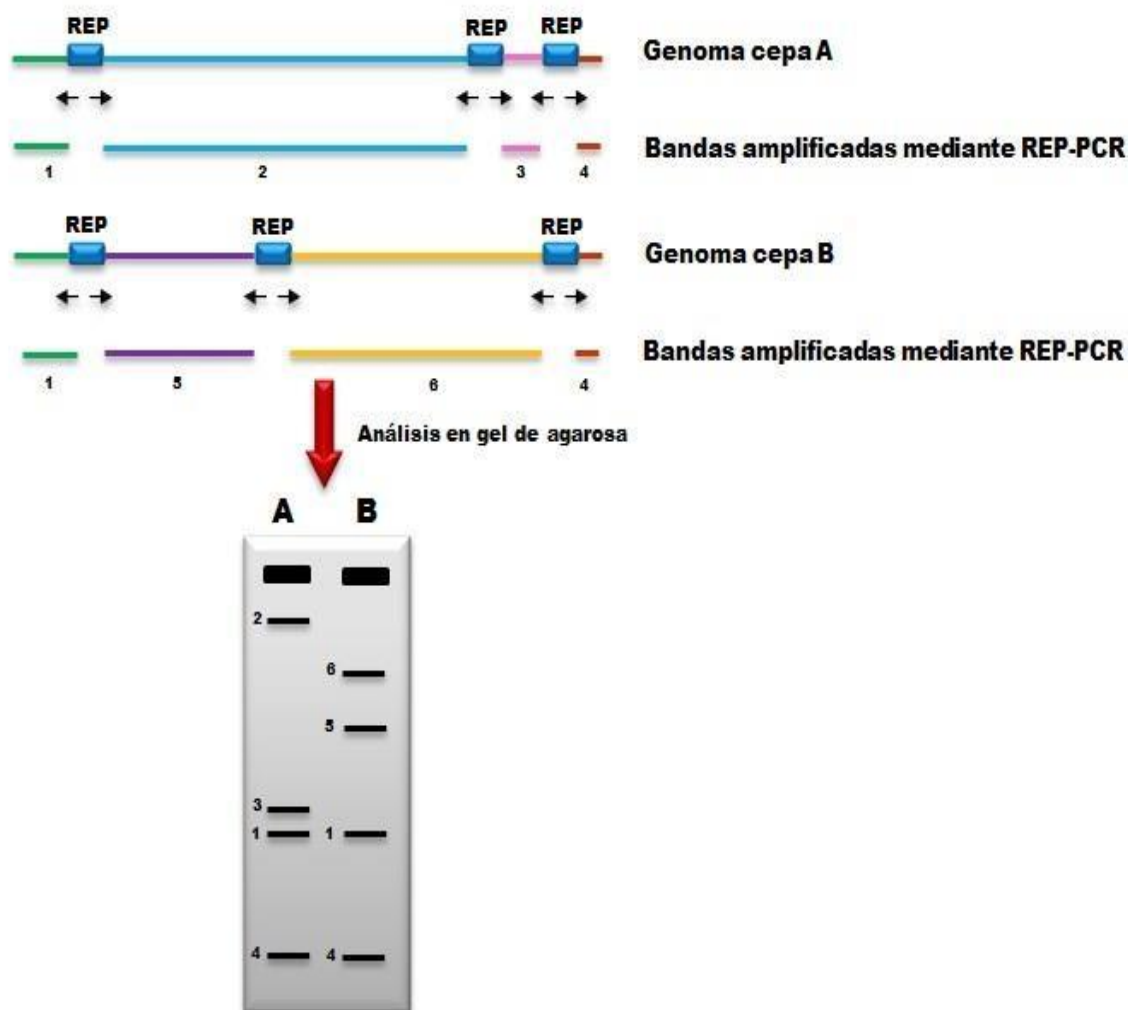
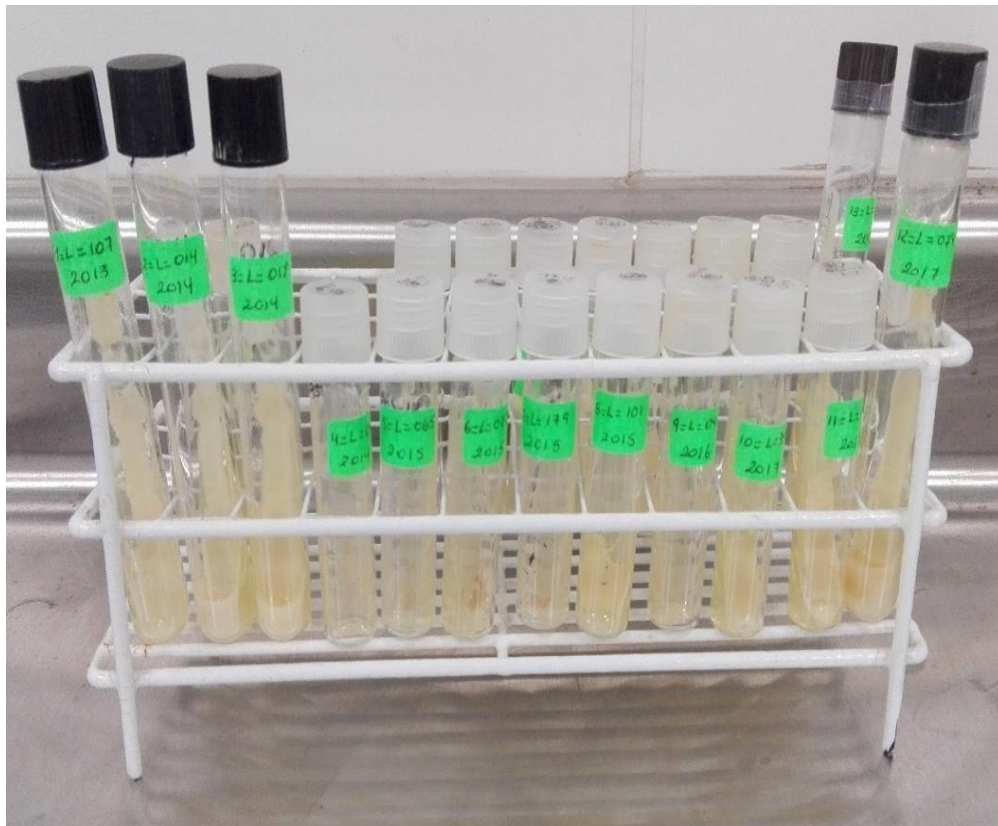


Diagrama esquemático de la prueba REP-PCR basada según Vélchez y Alonso (2009). Se representa la distribución hipotética de las secuencias repetitivas REP en una región de los genomas de dos cepas A y B. Utilizando iniciadores moleculares que reconocen estas secuencias REP, se amplifican las regiones espaciadoras extragénicas, obteniendo muchos fragmentos de diferentes tamaños (amplicones), la disposición de estos fragmentos representa las diferencias distintas en el genotipo del organismo, se separan en un gel de agarosa, mediante el cual se comparan los patrones de bandas entre las cepas.

ANEXO 2. Cepas proporcionadas por el laboratorio de investigación área de Micología



ANEXO 3. Reactivos empleados en extracción y purificación de ADN según protocolo Invitrogen. (2012).

Reactivos Kit Invitrogen	Cantidad
Tampón de digestión genómico	200 uL
Proteínasa K	20 uL
Tampón de lisis genómico	200 uL
Etanol el 96%	200 uL
Tampón de lavado genómico 1	500 uL
Tampón de lavado genómico 2	500 uL
Tampón genómico de elución	40 uL

ANEXO 4. Reactivos empleados en la electroforesis.

Medio	Concentración final	Volumen final	Cantidades
Gel de Agarosa	2%	70 mL	Agarosa 1.4 g Buffer TAE 1X 70 mL Agua destilada 5 mL
BUFFER TAE 1X	1X	100 mL	Buffer TAE 10X (TAE 10 mL- Agua destilada 90 mL)

ANEXO 5. Secuencia de iniciadores empelados para ERIC-PCR y REP-PCR

Oligonucleótido	Secuencia de los cebados
ERIC 1R	5'-A TG TAA GCT CCT GGG GAT TCA-3'
ERIC 2R	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGA GCG3'
REP 1R-I	5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3'
REP2-D	5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'

ANEXO 6. Concentraciones de reacción en ERIC-PCR para un volumen final de 12,5 µL

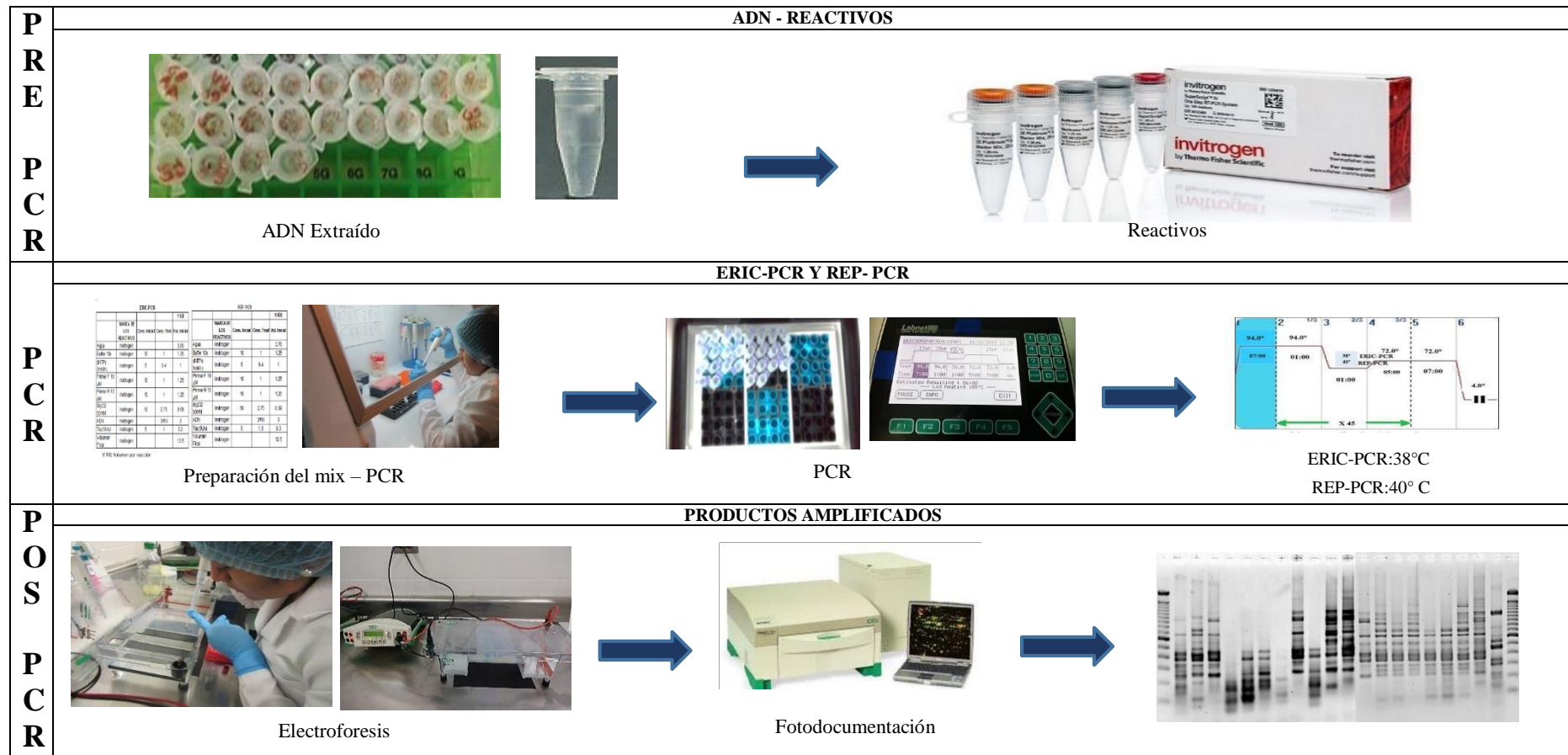
		1 RX		
	MARCA DE LOS REACTIVOS	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. Final (µL)
Agua				3,86
Buffer 10x	Invitrogen	10 X	1X	1,25
dNTPs 5mM/c	Invitrogen	5 mM	0,4 mM	1
Primer F 10 µM	Invitrogen	10 µM	1 µM	1,25
Primer R 10 µM	Invitrogen	10 µM	1 µM	1,25
MgCl ₂ 50mM	Invitrogen	50 mM	2,75 mM	0,69
Taq 5U/ul	Invitrogen	5 U	1 U	0,2
ADN	Invitrogen		3/RX	3
Volumen Final	Invitrogen			12,5

ANEXO 7. Concentraciones de reacción en REP-PCR para un volumen final de 12,5 µL.

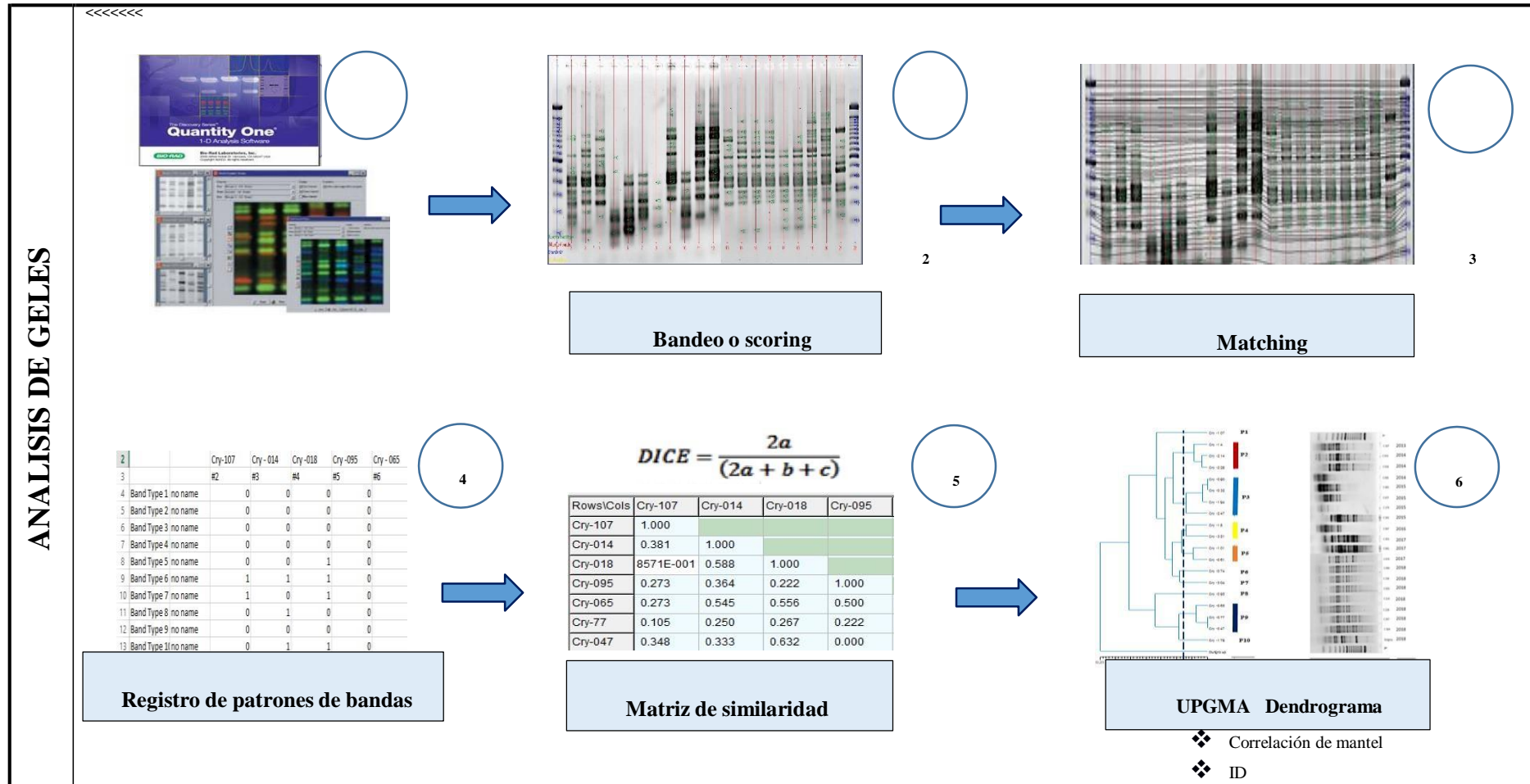
		1 RX		
	MARCA DE LOS REACTIVOS	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. Final (µL)
Agua				3,76
Buffer 10x	Invitrogen	10 X	1 X	1,25
dNTPs 5mM/c	Invitrogen	5 mM	0,4 mM	1
Primer F 10 µM	Invitrogen	10 µM	1 µM	1,25
Primer R 10 µM	Invitrogen	10 µM	1 µM	1,25
MgCl ₂ 50 mM	Invitrogen	50 mM	2,75 mM	0,69
Taq 5U/ul	Invitrogen	5 U	1,5 U	0,3
ADN	Invitrogen		3/RX	3
Volumen Final	Invitrogen			12,5

V Rx: Volumen por reacción

ANEXO 8. Proceso de la caracterización molecular de las cepas de *C. neoformans*.



ANEXO 9. Análisis bioinformático



ANEXO 10. Matriz Binaria obtenida de los perfiles electroforéticos mediante el cebador ERIC- PCR.

Cry-107	Cry 014	Cry 018	Cry 095	Cry 065	Cry 077	Cry-179	Cry-101	Cry 047	Cry 351	Cry 061	Cry 074	Cry 090	Cry 194	Cry 035	Cry 214	Cry 228	Cry 247	Cry 304	*
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0

Presencia (1); Ausencia (0) ; Cepa Outgroup (*).

ANEXO 11. Matriz Binaria obtenida de los perfiles electroforéticos mediante el cebador REP- PCR

Cry-107	Cry 014	Cry 018	Cry 095	Cry 065	Cry 077	Cry-179	Cry-101	Cry 047	Cry 351	Cry 061	Cry 074	Cry 090	Cry 194	Cry 035	Cry 214	Cry 228	Cry 247	Cry 304	*
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0

Presencia (1); Ausencia (0); Cepa Outgroup (*)

ANEXO 12. Matriz de similitud mediante el coeficiente de DICE, marcador ERIC-PCR.

Rows\Cols	Cry-107	Cry-014	Cry-018	Cry-095	Cry-065	Cry-77	Cry-047	Cry-351	Cry-061	Cry-74	Cry-090	Cry-101	Cry-194	Cry-35	Cry-214	Cry-228	Cry-247	Cry-304	Outgroup
Cry-107	1.000																		
Cry-014	0.381	1.000																	
Cry-018	8571E-001	0.588	1.000																
Cry-095	0.273	0.364	0.222	1.000															
Cry-065	0.273	0.545	0.556	0.500	1.000														
Cry-77	0.105	0.250	0.267	0.222	0.444	1.000													
Cry-047	0.348	0.333	0.632	0.000	0.462	0.200	1.000												
Cry-351	0.583	0.000	0.100	0.286	0.000	0.000	0.133	1.000											
Cry-061	0.545	0.545	0.667	0.000	0.167	0.000	0.615	0.143	1.000										
Cry-74	0.692	0.400	0.545	0.375	0.250	0.000	0.353	0.333	0.625	1.000									
Cry-090	0.519	0.375	0.348	0.118	0.235	0.000	0.222	0.316	0.353	0.476	1.000								
Cry-101	0.500	0.615	0.700	0.143	0.286	0.182	0.667	0.125	0.857	0.556	0.316	1.000							
Cry-194	0.667	0.375	0.435	0.118	0.235	0.000	0.333	0.316	0.588	0.571	0.818	0.526	1.000						
Cry-35	0.615	0.400	0.455	0.125	0.250	0.000	0.353	0.333	0.500	0.600	0.762	0.444	0.762	1.000					
Cry-214	0.615	0.400	0.545	0.125	0.375	0.154	0.588	0.333	0.500	0.700	0.571	0.556	0.571	0.700	1.000				
Cry-228	0.500	0.615	0.600	0.143	0.429	0.182	0.533	0.125	0.571	0.444	0.421	0.625	0.526	0.444	0.667	1.000			
Cry-247	0.600	0.316	0.385	0.200	0.200	0.235	0.286	0.455	0.400	0.500	0.720	0.364	0.720	0.583	0.500	0.545	1.000		
Cry-304	0.583	0.462	0.500	0.143	0.143	0.000	0.533	0.500	0.714	0.556	0.526	0.625	0.632	0.556	0.556	0.375	0.545	1.000	
Outgroup	0.118	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.222	0.000	0.182	0.167	0.000	0.167	0.000	0.182	0.000	0.133	0.222	1.000

ANEXO 13. Matriz de similitud mediante el coeficiente de DICE, marcador REP- PCR.

Rows\Cols	Cry-107	Cry-014	Cry-018	Cry-095	Cry-065	Cry-77	Cry-047	Cry-351	Cry-061	Cry-74	Cry-090	Cry-101	Cry-194	Cry-35	Cry-214	Cry-228	Cry-247	Cry-304	Outgroup
Cry-107	1.000																		
Cry-014	0.381	1.000																	
Cry-018	8571E-001	0.588	1.000																
Cry-095	0.273	0.364	0.222	1.000															
Cry-065	0.273	0.545	0.556	0.500	1.000														
Cry-77	0.105	0.250	0.267	0.222	0.444	1.000													
Cry-047	0.348	0.333	0.632	0.000	0.462	0.200	1.000												
Cry-351	0.583	0.000	0.100	0.286	0.000	0.000	0.133	1.000											
Cry-061	0.545	0.545	0.667	0.000	0.167	0.000	0.615	0.143	1.000										
Cry-74	0.692	0.400	0.545	0.375	0.250	0.000	0.353	0.333	0.625	1.000									
Cry-090	0.519	0.375	0.348	0.118	0.235	0.000	0.222	0.316	0.353	0.476	1.000								
Cry-101	0.500	0.615	0.700	0.143	0.286	0.182	0.667	0.125	0.857	0.556	0.316	1.000							
Cry-194	0.667	0.375	0.435	0.118	0.235	0.000	0.333	0.316	0.588	0.571	0.818	0.526	1.000						
Cry-35	0.615	0.400	0.455	0.125	0.250	0.000	0.353	0.333	0.500	0.600	0.762	0.444	0.762	1.000					
Cry-214	0.615	0.400	0.545	0.125	0.375	0.154	0.588	0.333	0.500	0.700	0.571	0.556	0.571	0.700	1.000				
Cry-228	0.500	0.615	0.600	0.143	0.429	0.182	0.533	0.125	0.571	0.444	0.421	0.625	0.526	0.444	0.667	1.000			
Cry-247	0.600	0.316	0.385	0.200	0.200	0.235	0.286	0.455	0.400	0.500	0.720	0.364	0.720	0.583	0.500	0.545	1.000		
Cry-304	0.583	0.462	0.500	0.143	0.143	0.000	0.533	0.500	0.714	0.556	0.526	0.625	0.632	0.556	0.556	0.375	0.545	1.000	
Outgroup	0.118	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.222	0.000	0.182	0.167	0.000	0.167	0.000	0.182	0.000	0.133	0.222	1.000