



INFORME BREVE

Genotipificación de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* obtenidos en el Hospital «Dr. Julio C. Perrando», de la ciudad de Resistencia (Chaco, Argentina)

Maria E. Cattana^{a,*}, Maria F. Tracogna^b, Mariana S. Fernández^a, Mariana C. Carol Rey^b, Maria A. Sosa^a y Gustavo E. Giusiano^a

^aDepartamento Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina

^bServicio de Microbiología, Hospital «Dr. Julio C. Perrando», Resistencia, Chaco, Argentina

Recibido el 16 de abril de 2013; aceptado el 20 de mayo de 2013

PALABRAS CLAVE

Genotipos;
Criptococosis;
Epidemiología

Resumen

La criptococosis es una infección fúngica causada por levaduras del género *Cryptococcus*, particularmente las del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. El conocimiento sobre la casuística de la criptococosis en el nordeste argentino es exiguo y no se tiene información sobre los tipos moleculares circulantes. El objetivo de este estudio fue realizar la caracterización genética de los aislamientos pertenecientes al complejo *C. neoformans/C. gattii* obtenidos en el Hospital «Dr. Julio C. Perrando» de la ciudad de Resistencia (Chaco, Argentina), con el fin de determinar especie, variedad y genotipo. Durante dos años y un mes se estudiaron 26 aislamientos clínicos. Mediante métodos convencionales y moleculares, un aislamiento fue identificado como *C. gattii* genotipo VGI y los 25 restantes como *C. neoformans* var. *grubii*, 23 de los cuales correspondieron al genotipo VNI y dos al genotipo VNII. Estos datos son una contribución al conocimiento de la epidemiología de la criptococosis en la Argentina y el primer informe sobre genotipos del complejo *C. neoformans/C. gattii* de origen clínico en el nordeste argentino.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: memiliacattana@yahoo.com.ar (M.E. Cattana).

KEYWORDS

Genotype;
Cryptococcosis;
Epidemiology

Genotyping of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex clinical isolates from Hospital "Dr. Julio C. Perrando", Resistencia city (Chaco, Argentina)

Abstract

Cryptococcosis is a fungal infection caused by yeast species of *Cryptococcus* genus, particularly *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. The knowledge of the cryptococcosis casuistic in northeastern Argentina is scarce and there is no information about the molecular types circulating in this area. The aim of this study was to genotyping *C. neoformans*/*C. gattii* complex clinical isolates obtained at Hospital "Dr. Julio C. Perrando", Resistencia city (Chaco, Argentina), in order to determine species, variety and molecular type. During two years and one month 26 clinical isolates were studied. Using conventional and molecular methods one isolate was identified as *C. gattii* VGI type, and 25 isolates as *C. neoformans* var. *grubii*; 23 of these belonged to VNI type and two belonged to VNII type. This data is a contribution to the knowledge of cryptococcosis epidemiology in Argentina and the first report about *C. neoformans*/*C. gattii* complex molecular types from clinical isolates in northeastern Argentina. © 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La criptococosis es una enfermedad fúngica oportunista causada por levaduras capsuladas del género *Cryptococcus*, particularmente las del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*. En el complejo se incluye a *Cryptococcus neoformans* con sus 2 variedades (*grubii* y *neoformans*) y sus 3 serotipos (A, D y el híbrido AD), y a *C. gattii* con sus 2 serotipos (B y C). Actualmente, con la aplicación de métodos moleculares se reconocen 8 tipos moleculares o genotipos principales de estas especies: tipos VNI y VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A), tipo VNIII (*C. neoformans* serotipo AD), tipo VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D), y los tipos VGI, VGII, VGIII y VGIV^{9,10} (*C. gattii*, serotipos B y C).

A fines del siglo XX, la incidencia de la criptococosis aumentó drásticamente como consecuencia del incremento de individuos inmunocomprometidos, favorecido por los tratamientos inmunosupresores y por la epidemia de sida. En Argentina la información epidemiológica sobre la criptococosis está basada en comunicaciones aisladas de hospitales que atienden principalmente población HIV positiva, por lo que en general se informa una alta prevalencia de *C. neoformans* var. *grubii*. Hasta el momento, el conocimiento sobre la casuística de la criptococosis en el nordeste argentino es exiguo y no hay información sobre los genotipos circulantes^{8,13}.

El objetivo de este estudio fue realizar la caracterización genética de los aislamientos clínicos pertenecientes al complejo *C. neoformans*/*C. gattii* obtenidos en el Hospital «Dr. Julio C. Perrando» de la ciudad de Resistencia (provincia del Chaco, Argentina), con el fin de determinar especie, variedad y genotipo.

Entre junio de 2010 y junio de 2012, se estudiaron levaduras del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Regional «Dr. Julio C. Perrando». Los aislamientos fueron recuperados de pacientes que en ese momento se encontraban internados en distintas salas del Hospital, principalmente en Unidad de Terapia Intensiva, Unidad de Aislamiento y Clínica Médica.

Las muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal, hemocultivo y esputo fueron procesadas en el Servicio de Microbiología de dicho hospital.

El análisis micológico de las muestras clínicas incluyó examen directo en fresco y con tinta china, coloraciones de Gram y coloración de May Grünwald-Giemsa. Los materiales biológicos fueron sembrados en medios para estudio bacteriológico y en 4 tubos de agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol 500 mg/l, e incubados a 28 °C y 35 °C.

Todas las levaduras que desarrollaron en agar Sabouraud y en los medios para bacterias fueron identificadas utilizando la prueba de urea de Christensen, observación de la micromorfología en agar-arroz y el sistema comercial API ID32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Posteriormente, todos los aislamientos identificados dentro del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* fueron remitidos al Departamento de Micología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste, donde se realizaron subcultivos en medios de Pal¹⁴ y en canavanina-glicina-azul de bromotimol⁶ (CGB) para su identificación fenotípica.

La identificación genotípica se realizó mediante una PCR-RFLP del gen *URA5*. Para la extracción de ADN se aplicó la metodología descrita previamente por Bosco Borgeat *et al.*². La reacción de PCR se llevó a cabo según lo descrito por Meyer *et al.*⁹; se sometieron los productos de la PCR a una doble digestión enzimática con *Sau96I* y *HhaI*. Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3 % a 100 V durante 5 horas. Los patrones de RFLP fueron asignados por comparación con los patrones obtenidos de cepas de referencia (de *C. neoformans* var. *grubii*: CBS 10085 VNI y CBS 10084 VNII; de *C. neoformans* híbrido AD: CBS 10080 VNIII; de *C. neoformans* var. *neoformans*: CBS 10079 VNIV; y de *C. gattii*: CBS 10078 VGI; CBS 10082 VGII; CBS 10081 VGIII y CBS 10101 VGIV).

Durante los 25 meses de trabajo se estudiaron 26 aislamientos provenientes de igual número de pacientes adul-

Tabla 1 Características de los pacientes e identificación de los 26 aislamientos del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* estudiados

Número de cepa	Sexo	Tipo de muestra	Enfermedad de base/ Condición inmune	Especie/ Tipo molecular	Medio CGB
L640	F	LCR	Sn enfermedad de base conocida	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L641	F	LCR	AR	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L692	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L693	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L694	M	BAL	Sn enfermedad de base conocida	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNII	Cn
L695	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L696	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L781	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cg
L782	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L783	M	LCR	LLC	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L784	F	Hemocultivo	LES	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L801	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L839	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L841	F	Espuito	Colangitis	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L865	F	LCR	LES	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L866	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L872	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L873	F	Hemocultivo	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L879	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L889	M	LCR	Linfoma de Hodgkin	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L897	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L898	F	Hemocultivo	HIV/ TBC	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L899	M	LCR	HIV	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L902	F	AT	Grrosis	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	Cn
L915	F	LCR	LES	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNII	Cn
L1011	M	LCR	HIV	<i>C. gattii</i> VGI	Cg

F: femenino; M: masculino; AR: artritis reumatoidea; AT: aspirado traqueal; BAL: lavado broncoalveolar; LCR: líquido cefalorraquídeo; LES: lupus eritematoso sistémico; LLC: leucemia linfoblástica crónica; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; TBC: tuberculosis; Cn: *Cryptococcus neoformans*; Cg: *Cryptococcus gattii*.

tos, 17 varones y 9 mujeres, con edades comprendidas entre los 22 y 60 años (mediana de edad: 33,5 años).

Este estudio fue oportunamente aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste.

El número de casos encontrados en el lapso estudiado coincide con los resultados de un estudio multicéntrico de criptococosis realizado en Argentina, en el cual informan 12 casos por año para la provincia del Chaco³.

Todos los aislamientos presentaron actividad ureásica y coloración marrón en el medio de Pal. Los datos de los aislamientos estudiados y los resultados obtenidos del análisis molecular se presentan en la tabla 1.

La identificación molecular se correspondió en todos los casos con lo observado mediante el cultivo en el medio de CGB, a excepción de un caso donde, en ese medio, se presen-

tó un falso positivo (tabla 1, cepa L781). La bibliografía existente documenta tanto resultados falsos positivos como falsos negativos, lo que sugiere que si bien el medio de CGB es útil, económico y fácilmente aplicable a la rutina del laboratorio para una identificación presuntiva, para la identificación definitiva se debe utilizar un método molecular^{5,7,12}.

En cuanto a la distribución de la enfermedad de acuerdo al sexo, la relación hombre/ mujer fue de 1,89. Se observó un predominio de casos en el sexo masculino, similar al que se observa en infecciones por HIV en el país, según lo informado en el Boletín sobre el VIH-sida en la Argentina de 2011¹¹. En nuestro estudio, 14 de 16 pacientes con HIV y criptococosis fueron hombres. Por el contrario, de los 10 pacientes con criptococosis que no padecían HIV, 7 fueron mujeres.

En este estudio, 16 de los 26 pacientes eran HIV positivo. Este valor es menor al informado por el estudio multicéntri-

co de criptococosis y por hospitales de nuestro país, donde hasta el 80 % de los casos están asociados al HIV^{1,3,13}. En 8 pacientes se presentaron causas predisponentes distintas al HIV, entre ellas lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea, colangitis, leucemia linfoblástica crónica, linfoma de Hodgkin y cirrosis.

Se presentaron 2 casos de criptococosis en pacientes sin evidencia de inmunocompromiso. En ambos se aisló *C. neoformans* var. *grubii*, uno genotipo VNI y el otro genotipo VNII. Si bien *C. neoformans* afecta mayormente a pacientes inmunocomprometidos, se sabe que alrededor de un 20 % padecen criptococosis por esta especie siendo inmunocompetentes. De la misma manera, si bien *C. gattii* afecta más a inmunocompetentes, hay aproximadamente un 14 % de pacientes con criptococosis por este agente que son inmunocomprometidos¹⁰. También se ha postulado una asociación entre el tipo molecular de *C. gattii* y el tipo de hospedero: VGI y VGII tendrían mayor relación con pacientes inmunocompetentes y los genotipos VGIII y VGIV con inmunocomprometidos, incluyendo HIV/ sida⁴. Sin embargo, el único aislamiento en esta casuística de *C. gattii* fue VGI y se obtuvo de un paciente HIV positivo. Los genotipos VGI y VGII son los que refieren menor sensibilidad a los antifúngicos y mayores niveles de heterorresistencia, especialmente al fluconazol, droga utilizada normalmente como terapia de mantenimiento y terapia profiláctica para la criptococosis¹⁵. Este hecho destaca la importancia de la tipificación molecular, ya que puede brindar una importante información para orientar respecto del tratamiento y la profilaxis.

Veintitrés de los 25 aislamientos tipificados como *C. neoformans* var. *grubii* correspondieron al genotipo VNI y 2 al VNII. Esto concuerda con los informes que señalan a *C. neoformans* genotipo VNI como el causante de la mayoría de las criptococosis en pacientes inmunocomprometidos, y que es este el genotipo más prevalente en el ambiente en todo el mundo^{9,10,13}.

Estos datos son una contribución al conocimiento de la epidemiología de la criptococosis en la Argentina y el primer informe sobre genotipos del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* de origen clínico en el nordeste argentino.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

El apoyo financiero de este trabajo fue proporcionado por la Fundación Alberto J. Boemmers.

Bibliografía

1. Bava AJ, Negrón R. Características epidemiológicas de 105 casos de criptococosis diagnosticados en la República Argentina entre 1981-1990. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992;34:335-40.
2. Bosco Borgeat ME, Mazza M, Refojo N, Taverna M. Tipificación molecular de especies del género *Cryptococcus*. En: Merino LA, Giusiano G, editores. Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos, 1.ª edición. Buenos Aires, Asociación Argentina de Microbiología, 2011, p. 164-6.
3. Bosco Borgeat ME, Taverna CG, Murisengo O, Mazza M, Canteros CE, Davel G, Grupo de estudio de criptococosis en Argentina. Estudio Multicéntrico de Criptococosis en Argentina-Estado de Avance del Primer Año. XII Congreso Argentino de Microbiología, Resumen O53-27882. *Rev Argent Microbiol*. 2010;42 Supl 1:21.
4. Byrnes EJ, Li W, Ren P, Lewit Y, Voelz K, Fraser JA, Dietrich FS, May RC, Chatuverdi S, Chatuverdi V, Heitman J. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in Southern Californian HIV/AIDS patients. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002205.
5. Khan ZU, Al-Anezi AA, Chandy R, Xu J. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *J Med Microbiol*. 2003;52:271-5.
6. Kwon-Chung KJ, Polachek I, Bennett JE. 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;15:535-7.
7. Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC, Vainstein MH. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Med Mycol*. 2008;46:377-83.
8. Martín Mazuelos E, Aller García AI. Aspectos microbiológicos de la criptococosis en la era post-TARGA. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28 Supl 1:40-5.
9. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:189-95.
10. Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. *Australian Biochemist*. 2010;41:11-5.
11. Ministerio de Salud de la Nación. Boletín sobre el VIH-sida en la Argentina. Buenos Aires, Argentina. 2012; Año XV: N.º 29.
12. Nakamura Y, Kano R, Sato H, Watanabe S, Takahashi H, Hasegawa A. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromthymol blue medium. *Mycoses*. 1998;41:35-40.
13. Negrón R. Cryptococcosis. *Clin Dermatol*. 2012;30:599-609.
14. Pal M, Mehrotra BS. Studies on the efficacy of sunflower seed agar for the isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. *Arogya-J. Health Sci*. 1982;8:74-9.
15. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lázera M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. *Med Mycol*. 2012;50:328-32.