

Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*

Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex

Patricia Escandón¹, Andrés Montilla¹

Resumen

La tipificación molecular de los aislamientos del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* constituye hoy en día una nueva herramienta para la vigilancia de este importante patógeno oportunista.

Por medio de esta comunicación queremos dar a conocer al cuerpo médico y de laboratorio en Colombia, la importancia de la PCR huella digital en el estudio de la diversidad genética de los aislamientos del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* obtenidos en el país. Adicionalmente, los resultados obtenidos a partir de la tipificación molecular nos permiten complementar la información recolectada en la encuesta nacional sobre la criptococosis liderada por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

Los aislamientos del complejo se pueden clasificar en ocho patrones moleculares de acuerdo con la técnica de PCR huella digital con iniciadores universales, que permite agrupar a los miembros del complejo según su especie, en el caso de *C. neoformans*, de acuerdo con su variedad. Realizar la vigilancia molecular de los aislamientos del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* es una herramienta epidemiológica de gran va-

lor, teniendo en cuenta que la criptococosis ha adquirido en los últimos años un gran interés debido al creciente número de pacientes inmunosuprimidos.

Palabras claves: Criptococosis, *Cryptococcus neoformans*, vigilancia, Colombia, epidemiología molecular.

Abstract

The molecular typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex is an useful tool for the molecular surveillance of this important opportunistic pathogen. The aim of this short communication is to inform physicians and laboratory personnel in Colombia about the importance of PCR fingerprinting in the comprehensive study of the genetic diversity of the *C. neoformans*/*C. gattii* species complex in the country. Furthermore, the results obtained from this molecular typing will enable us to complement the information gathered during the National Survey about cryptococcosis lead by the Microbiology Group of the Instituto Nacional de Salud.

Correspondencia:

Patricia Escandón. Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud. Dirección electrónica: pescandon@ins.gov.co

Recibido: 29/09/2009; Aceptado: 10/07/2010

¹ Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud

Isolates of the complex can be classified in 8 molecular patterns according to PCR fingerprinting using universal primers, which allows grouping the members of the complex according to species and, for *C. neoformans*, according to variety.

The molecular surveillance of the *C. neoformans*/*C. gattii* species complex isolates has become an epidemiological tool of great value since cryptococcosis has gained an important relevance in recent years due to the increasing number of immune-suppressed patients.

Key words: Cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, surveillance, Colombia, molecular epidemiology

La criptococosis es una de las micosis sistémicas de gran importancia mundial que compromete principalmente a la población inmunosuprimida, por ejemplo, los pacientes con leucemias, linfomas, sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Cushing's y los pacientes que consumen altas dosis de corticoesteroides como los transplantados. Sin embargo, la población más susceptible es la infectada por el VIH; y debido a la pandemia VIH/sida el número de casos por neuroinfección también ha aumentado.

Actualmente, los miembros del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* se pueden agrupar en dos especies relacionadas: *C. neoformans*, conformadas por las variedades *grubii* (serotipo A) y *neoformans* (serotipo D) y un híbrido serotipo AD; y *C. gattii*, con los serotipos B y C. Recientemente se ha demostrado que se pueden generar híbridos entre los serotipos BD y AB⁽¹⁻⁴⁾. Las dos especies presentan variaciones epidemiológicas, ecológicas y moleculares lo suficientemente amplias como para ser consideradas como especies diferentes. Por ejemplo, se sabe que *C. neoformans* afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos, mientras que *C. gattii* se ha aislado principalmente de personas inmunocompetentes⁽⁵⁻⁹⁾.

La criptococosis no es una enfermedad de notificación obligatoria en ningún lugar del mundo, excepto en la provincia de British Columbia en Canadá. En Colombia existe muy poca información sobre su incidencia, y principalmente en los grupos de alto riesgo, no obstante, el Grupo colombiano de estudio de la criptococosis ha unido esfuerzos para lograr que esta importante entidad adquiriera la relevancia que merece en la salud pública del país. Como resultado de esta iniciativa, en 2007 se publicó el más reciente estudio epidemiológico de la enfermedad en Colombia a partir de los nueve años de la Encuesta Epidemiológica sobre la Criptococosis (que se puede ser descargar de <http://www.cib.org.co>), la cual pretende identificar las características demográficas de la población afectada, conocer los factores de riesgo, la extensión de la diseminación de la infección al momento del diagnóstico y los métodos de laboratorio empleados para establecerlo, la especie del agente causal y el tratamiento inicial de los pacientes infectados por aislamientos del complejo⁽¹⁰⁾.

Esta encuesta reveló que para el año 2005 la incidencia promedio anual de criptococosis fue de 2,4 casos x 10⁶ en la población general, mientras que en los pacientes con sida era de 3 casos x 10³. Se encontró que el 95,9% de los aislamientos pertenecieron al serotipo A; 0,3% al D; 3,3% al B; y 0,5% al C⁽¹⁰⁾.

Para realizar estudios epidemiológicos y genéticos del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* se han empleado diferentes técnicas de tipificación molecular, las cuales han demostrado un alto poder discriminatorio al agrupar los aislamientos en diferentes patrones moleculares. Dentro de estas técnicas moleculares predominan la PCR huella digital con iniciadores universales como el M13, (GACA)₄ y (GTG)₅^(8, 9, 11, 12), el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP)⁽¹³⁾, el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de los genes *URA5* y *PLB1*^(9, 14) y la tipificación de secuencias multilocus (MLST) empleando siete genes con-

servados (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* y la región *IGS1*)^(15, 16). En la tabla 1 se muestra la concordancia de especies y serotipos con los diferentes patrones obtenidos de las técnicas de tipificación actual.

La tipificación molecular de los aislamientos del complejo ofrece ventajas como la facilidad de que todos los aislamientos sean caracterizados empleando la misma técnica, la no dependencia de la expresión de las características fenotípicas y la facilidad y rapidez de la técnica; sin embargo, también se presentan ciertas desventajas como la falta de reproducibilidad inter e intra laboratorios, y en especial la falta de un consenso entre los resultados obtenidos con las diversas técnicas de tipificación; en la actualidad no hay un método de tipificación estándar para el estudio molecular de este patógeno, por lo cual se sugiere que los laboratorios empleen la Multilocus Sequence Typing (MLST) como técnica universal⁽¹⁶⁾.

La MLST ha sido propuesta por el grupo de trabajo en Genotipificación de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* de la *International Society for Human and Animal Mycoses* (ISHAM) como técnica universal para el estudio molecular de los aislamientos del complejo (<http://cneoformans.mlst.net>). Sin embargo, este mismo organismo reconoce que las técnicas

moleculares empleadas por los diversos grupos de trabajo en el mundo, como las PCR huella digital, utilizando iniciadores microsátélites (M13) o minisátélites (GACA₄ y GTG₅) y el análisis mediante AFLP, pueden agrupar los aislamientos en ocho patrones moleculares principales. Por lo tanto, hoy en día se acepta el uso de la nomenclatura VNI a VNIV y VGI a VGIV debido a que se correlaciona con el concepto actual acerca de la existencia de dos especies dentro del complejo con base en el estudio de más de 2000 aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii*, entre ellos *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A, VNI continúa siendo el patrón molecular prevalente a escala mundial.

Las técnicas moleculares mencionadas han permitido establecer la relación entre un genotipo en particular y su origen geográfico, como el caso del brote de criptococosis originado en la isla de Vancouver, Canadá, en el cual, con el empleo de la MLST de ocho loci polimórficos (*SX1a* o *SX1α*, *IGS1*, *TEF1*, *GPD1*, *LAC1*, *CAP10*, *PLB1* y *MPD1*) se logró sugerir dos posibles orígenes geográficos (Australia o Sudamérica) para los aislamientos causantes del brote⁽¹⁷⁾.

El primer estudio de tipificación molecular hecho con aislamientos colombianos mostró que el patrón molecular VNI era el prevalente (45,2%) tanto en aislamientos clínicos como ambienta-

Tabla 1. Concordancia de los genotipos de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* empleando diferentes técnicas de tipificación molecular.

| | Serotipo | PCR Huella digital Meyer et al. ^(8, 9, 11) | AFLP Boekhout et al. ⁽¹³⁾ | RFLP URA5 Meyer et al. ⁽⁹⁾ | RFLP PLB1 Latouche et al. ⁽¹⁴⁾ |
|---|----------|--|---|--|--|
| <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> | A | VNI | AFLP1 | VNI | A1 |
| | A | VNII | AFLP1A | VNII | A2 |
| | A | ---- | VNB | ---- | ---- |
| <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> | D | VNIV | AFLP2 | VNIV | A4 |
| Híbrido AD | AD | VNIII | AFLP3 | VNIII | A3 (A1,A4) |
| <i>C. gattii</i> | B/C | VGI | AFLP4 | VGI | A5 |
| | B/C | VGII | AFLP6 | VGII | A6 |
| | B/C | VGIII | AFLP5 | VGIII | A7 |
| | B/C | VGIV | AFLP7 | VGIV | A8 |

les del complejo ⁽⁹⁾. Estudios posteriores hechos en el Grupo de Microbiología han indicado que el patrón molecular VNI continúa siendo el más frecuente entre los aislamientos del serotipo A ⁽¹¹⁾, lo que concuerda con lo reportado en la literatura ⁽¹²⁾ como el genotipo que causa en la mayoría de casos la criptococosis en pacientes inmunosuprimidos. Por otra parte, el predominio del patrón molecular VGII entre los aislamientos de *C. gattii* serotipo B ^(9, 11) es similar a lo encontrado en Vancouver, donde se reportó un brote de criptococosis ocasionado por este genotipo ⁽⁷⁾.

La serotipificación de los aislamientos del complejo fue usada ampliamente durante muchos años como instrumento para estudios epidemiológicos; sin embargo, debido a la falta de antisueros comerciales, las herramientas moleculares han entrado a jugar un papel importante, ya que permiten responder interrogantes que pueden influenciar el manejo, la terapia y la vigilancia de este importante patógeno.

El estudio del polimorfismo molecular de los microorganismos infecciosos ha permitido entender mejor la epidemiología de estos agentes. Por lo tanto, la vigilancia molecular de los aislamientos del complejo *C. neoformans/C. gattii* que están circulando en Colombia, junto con los datos primordiales obtenidos por la encuesta nacional, nos permitirá ampliar nuestro conocimiento acerca de esta micosis, la cual adquiere día a día una mayor jerarquía en las enfermedades de salud pública que afectan a nuestro país.

Referencias

1. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 838-840.
2. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concept supports one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 574-587.
3. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6: 599-607.
4. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G, et al. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* hybrid. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 1105-1108.
5. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Revs.* 1995; 8: 515-548.
6. Lazéra MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezera CCF, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol* 1996; 34: 127-131
7. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17258-17263.
8. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA- a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999; 20: 1790-1799.
9. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, Ibero-American Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Ibero-American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 189-195.
10. Lizarazo J, Linares M, De Bedout C, Restrepo A, Agudelo C, Castañeda E et al. Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomedica* 2007; 27: 94-109
11. Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 625-635.
12. Ellis D, Marriott D, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol* 2000;38 (Suppl. 1):173-82.
13. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2001; 147: 891-907.
14. Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC, Meyer W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 2080-2086.
15. Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* 2006; 172: 2223-2238.
16. Meyer W, AAnensen D, Boekhout T, Cogliati M, Diaz M, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2009;47(6): 561-70.
17. Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezman S, et al. Same sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 2005; 437: 1360-1364