

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* EN GUAYAQUIL, ECUADOR

**Autores:** Sunny Sánchez<sup>1</sup>, Dolores Zambrano<sup>1</sup>, Sebastián Orozco<sup>1</sup>, Maylen García<sup>2</sup>.

## **Afiliación institucional**

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Médicas “Dr. Enrique Ortega Moreira”, Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador

<sup>2</sup>Unidad de Infecciones de Transmisión Sexual, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-MSP, Guayaquil, Ecuador

## **RESUMEN**

**Introducción:** La criptococosis es una infección fúngica oportunista que representa un alto costo tanto en vidas humanas como para la economía de los países. Su agente causal, el complejo de especies *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*, posee fase sexuada y asexuada, cuatro serotipos principales y siete variedades moleculares con diferencias clínico-epidemiológicas, fenotípicas y de sensibilidad a los antifúngicos.

**Objetivo:** Caracterizar molecularmente los aislados clínicos de *C. neoformans* de Guayaquil, Ecuador.

**Materiales y métodos:** Se determinó el tipo de apareamiento, el serotipo y variedad molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa y análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción a 27 aislados levaduriformes previamente identificadas como *C. neoformans* por métodos convencionales. Estos fueron recuperados a partir de líquido cefalorraquídeo de pacientes con síndrome neurológico de pacientes seropositivos al VIH, ingresados en el Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña” entre diciembre 2013 a enero 2015.

**Resultados:** Se demostró el amplio predominio de *C. neoformans* serotipo A, MAT $\alpha$  y genotipo VNI entre los aislados estudiados.

**Conclusiones:** Estos datos son similares a los obtenidos en otros países y constituyen los primeros de su tipo en Guayaquil, Ecuador por lo que constituyen un aporte importante al conocimiento de la criptococosis en este país.

**Palabras claves:** criptococosis, VIH, sida, *Cryptococcus neoformans*, genotipo, Ecuador.

## **Introducción**

En el reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Estadísticas Sanitarias Mundiales 2012, Ecuador junto a Colombia, se encuentran entre los países de la región de las Américas con más altas tasas de prevalencia de casos de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) durante el 2009 (275 y 342 por 100 000 habitantes respectivamente); exhibiendo una tasa de mortalidad por esta enfermedad de 16 por 100 000 habitantes (OMS, 2013). En Ecuador, el 74,05% de los casos nuevos con VIH-sida se concentran en la costa y el 23,32% en la sierra, donde Pichincha y Guayas tienen más del 60% de los casos. Esta enfermedad se encuentra dentro de las 10 causas principales de mortalidad en la última provincia («SIISE», s. f.).

Con la pandemia del sida las micosis se han convertido en un factor importante, presentando un cuadro clínico más agudo, con tendencia a la diseminación y una evolución más grave (Mandell, Douglas, & Bennett, 2011). Hasta el momento no existe información publicada sobre la situación de las micosis oportunistas en los pacientes con VIH-sida en Ecuador. Sin embargo, se realizó un trabajo en el Hospital de Infectología de Guayaquil, en el que la criptococosis era la cuarta causa de ingreso por infección oportunista (Chiang, Tettamanti, & Castro, 2010).

Criptococosis es una infección fúngica causada por cepas encapsuladas del *phylum Basidiomycota*, género *Cryptococcus*. Se reconoce que su agente causal es el complejo de especies *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*. Este comprende nueve tipos moleculares los cuales muestran buena correlación con las especies del complejo, sus variedades y serotipos: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) abarca los tipos genéticos AFLP1, AFLP1a y AFLP1b; *C. neoformans* var. *neoformans* (ser D) el AFLP2 y *C. neoformans* intervariedad AD el AFLP 3; por su parte *C. gattii* (serotipos B y C) incluye los tipos AFLP4, AFLP5, AFLP6 y AFLP7 (Sidrim et al., 2010).

Se conoce que este hongo tiene especial tropismo por el sistema nervioso central (SNC), y causa meningoencefalitis con síntomas difusos entre los que destacan cefalea, fiebre, trastornos visuales y alteración de sensorio (Brizendine & Pappas, 2010). El conocimiento de la ubicación taxonómica exacta de este agente permite realizar inferencias sobre su patogenicidad, patrones de virulencia, de susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de primera

línea de tratamiento y otras características clínico-epidemiológicas de interés. A su vez, estos factores ayudan en la determinación de la gravedad y la evolución de la enfermedad en estos pacientes (Escandón & Montilla, 2010).

El diagnóstico se basa en el aislamiento del hongo a partir de tejido o fluidos corporales como esputo, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR). Sin embargo, estos métodos pueden requerir varios días para la detección adecuada, además de poseer limitaciones que pueden dificultar el diagnóstico (Huston & Mody, 2009) (Rivera, Gaviria, Muñoz-Cadavid, Cano, & Naranjo, 2015) . Por tanto, las limitaciones de diagnóstico y aumento de la incidencia de infecciones por hongo, conllevó al desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y precisos mediante la aplicación de técnicas moleculares.

Hasta el momento no existen datos autóctonos de Ecuador sobre características moleculares de esta micosis y a su agente causal. Dada la relevancia clínico-epidemiológica de estas características, el presente trabajo se plantea como meta determinar las mismas en los aislamientos obtenidos de pacientes procedentes del Hospital de Infectología de Guayaquil, institución que atiende al 37% de los pacientes con VIH-sida de Ecuador. Estos resultados permitirán una mejor comprensión sobre la situación la criptococosis en Guayaquil, predecir la evolución de la enfermedad y mejorar los protocolos de tratamiento de los pacientes afectados.

## **Métodos**

Estudio transversal, no experimental, que determinó el tipo de apareamiento, el serotipo y variedad molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción a 27 aislados levaduriformes previamente identificadas como *C. neoformans* por métodos convencionales. Estos fueron recuperados a partir de líquido cefalorraquídeo de pacientes con síndrome neurológico de pacientes seropositivos al VIH, ingresados en el Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña” entre diciembre 2013 a enero 2015.

Las muestras fueron trasladadas a los laboratorios de Microbiología e investigación de la Universidad Espíritu Santo (UEES), previa autorización del Decano de la Facultad de Ciencias Médicas, para su procesamiento. Se realizó

la observación directa de la muestra por el método de tinta china con el objetivo de detectar la presencia de levaduras capsuladas; cultivo en agar de Sabouraud e identificación por métodos de caracterización fenotípica, siguiendo los protocolos establecidos internacionalmente.

Los aislamientos capaces de hidrolizar la urea y que no filamentaron, fueron considerados presuntivamente *Cryptococcus* spp. La identificación de los mismos se confirmó mediante la galería comercial de pruebas bioquímicas API 20 C según instrucciones del fabricante (BioMérieux, Francia). Paralelamente se efectuó resembrado de las mismas en medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) para diferenciar entre las especies *C.gatti* y *C.neoformans*. Posteriormente se realizó pruebas de susceptibilidad microbiológica y caracterización molecular, serotipo y tipo de apareamiento mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se realizó el proceso de consentimiento informado, cuya aceptación quedó evidenciada a través de la firma de un documento por el paciente o familiar. Se usaron códigos numéricos para mantener la confidencialidad de los resultados. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética COBI-ASFORUM, que está certificado por las autoridades locales de salud de Ecuador.

## **Resultados**

El número de individuos hospitalizados con VIH-Sida en período de estudio fue de 450. De los cuales, 100 (24,4%) presentaron síndrome neurológico infeccioso, a partir de ello se obtuvieron 85 muestras de LCR. Se obtuvieron 35 (39,02%) muestras positivas mediante examen directo con tinta china; de estas sólo se recuperó el 77% de aislados levaduriformes en Agar Sabouraud. Todos ellos fueron capaces de asimilar la urea, solo produjeron blastoconias en agar harina de maíz con Tween 80 y no modificaron el medio CBG, características compatibles con *Cryptococcus neoformans*.

Tomando como referencia el aislamiento de *Cryptococcus* a partir del LCR de los pacientes seropositivos al VIH con síndromes neurológicos incluidos en este estudio, la prevalencia de la infección por esta levadura fue cercana al 33%. El análisis descriptivo de la población con diagnóstico de criptococosis

arrojó que el 100% de los individuos pertenecían al género masculino y que más de la mitad se ubica entre los 20 y 30 años de edad.

Se demostró el amplio predominio de *C. neoformans* serotipo A, MAT $\alpha$  y genotipo VNI entre los aislados estudiados. La caracterización molecular de los aislamientos recuperados de LCR demostró que 24 de ellos pertenecen al serotipo A, al tipo de apareamiento MAT $\alpha$  y al genotipo VNI.

En los restantes aislados no se logró amplificar el fragmento *URA5* por lo que no se pudo determinar su serotipo, apareamiento ni variedad molecular. En la figura 1 se muestra la imagen de una corrida electroforética en la que se visualiza la amplificación de fragmentos de 1 200 pb.

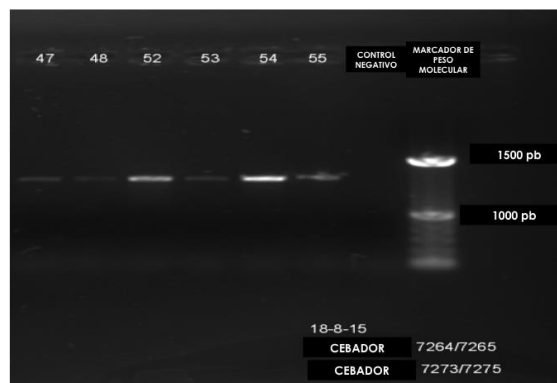


Figura 1. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2% de los fragmentos amplificados mediante PCR multiplex. Obsérvese el amplicón de 1 200 pb.

## Discusión

*C. neoformans* es un hongo oportunista que afecta con frecuencia a individuos infectados por el VIH tipo 1 (VIH-1) (Cogliati, 2013) (Mazuelos & García, 2010). Debido a componentes fisiológicos y ambientales propios de los organismos afectados, como concentración de hierro, temperatura, cambio de pH y factores de acoplamiento asociados a estos hongos. Tienen la capacidad de generar mecanismos que les otorgan virulencia, como es el caso de la producción de la cápsula. La aplicación de métodos moleculares permite la identificación del complejo complejo *C. neoformans/C. gattii* y otras descritas con menor frecuencia como *C. laurentii* por lo que suelen brindar resultados más completos que el diagnóstico convencional con lo cual contribuyen a una

mejor comprensión de la epidemiología y la historia natural de la criptococosis (Bovers, Hagen, & Boekhout, 2008).

Según los reportes consultados, los porcentajes de la patología varían desde 2% en Europa Occidental y Estados Unidos (Hasimoto e Souza et al., 2013) hasta 91% (Mwaba et al., 2001) en Sudáfrica. Se observa variaciones considerables que se atribuyen al medio en que se realiza la investigación, en este estudio se obtuvo una prevalencia cercana al 33%. Además, concuerdo con reportes internacionales en relación a la mayor frecuencia en individuos del género masculino (Imwidthaya & Pongvarin, 2000; Kumar et al., 2008).

La caracterización molecular de los aislamientos pudiera ser de gran utilidad en el manejo de los pacientes afectados por criptococosis. Los métodos moleculares se emplean para la detección de secuencias genéticas específicas del complejo *C. neoformans*, tanto a partir de muestras clínicas como de cultivos (Bovers et al., 2008). Puesto que presentan una mejor sensibilidad y especificidad comparado con métodos convencionales (Rivera et al., 2015).

Los resultados del presente trabajo son muy similares a lo encontrado en Asia, Europa y América Latina. En Seul a partir de 46 aislados, se determinó mediante RFLP Y MLST que el 100% de ellos pertenecían al serotipo A, tipo de apareamiento  $\alpha$  y variedad molecular VNI (Park, Kim, Joo, & Hwang, 2014). Otros estudios, de 57 aislados clínicos de *C. neoformans* se reportaron 51 *C. neoformans* var. *grubii* (VNI); uno *C. neoformans* var. *neoformans* (VNIV) y cinco *C. gattii* (VGII) (Jain et al., 2005).

Colombia es quizás el país de América Latina que más ha estudiado la situación molecular de sus aislados de *Cryptococcus*. Los resultados de la encuesta epidemiológica sobre criptococosis, llevada a cabo en este país y publicada en 2007 revelaron que los aislados más frecuentes fueron del serotipo A (95,9%). Dicha encuesta otorgó información valiosa acerca de las variedades moleculares circulantes en nueve países de la región (Meyer, Castaneda, Jackson, Huynh, & Castaneda, 2003). Posteriormente, el trabajo de Sánchez en Bogotá, arrojó un amplio predominio de *C. neoformans* (35 aislados, de los cuales 93% eran MAT $\alpha$  y 82,9% VNI) vs *C. gattii* (19 aislados,

de ellos 47,5% correspondieron a MATa y 52,6% VGII) (Sánchez, Escandón, & Castañeda, 2008).

El diagnóstico preciso de las infecciones por hongos es muy difícil, por la variedad de especies descritas. Sin embargo, no todas tienen la capacidad de producir cuadros infecciosos en humanos. En este punto, las técnicas moleculares toman ventaja en comparación a las convencionales, puesto que pueden identificar las especies con bajas carga y variedades fúngicas (Sato, Maeda, Umeda, Miyajima, & Makimura, 2011); lo que la convierte en un método de ayuda diagnóstico adecuado.

### Conclusiones

Se evidencia que en la población estudiada predominó *C. neoformans* serotipo A, MAT $\alpha$  y genotipo VNI, datos obtenidos son similares a los reportados en otros países y constituyen los primeros de su tipo en Guayaquil, Ecuador. Por tanto, es un aporte importante al conocimiento de la criptococosis en este país. Por ello, se recomienda realizar estudios en periodos mayores con la finalidad de obtener mayores muestras que permitan la elaboración de conclusiones más certeras.

### Referencias

- Bovers, M., Hagen, F., & Boekhout, T. (2008). Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), S4-12.
- Brizendine, K. D., & Pappas, P. G. (2010). Cryptococcal meningitis: current approaches to management in patients with and without AIDS. *Current Infectious Disease Reports*, 12(4), 299-305.  
<http://doi.org/10.1007/s11908-010-0113-4>
- Chiang, H., Tettamanti, D., & Castro, G. (2010). Tinta china en orina como método de diagnóstico en criptococosis diseminada asociado a VIH/sida. Estudio transversal realizado en el hospital de infectología « José Rodríguez M.» durante el año 2009. *Rev Med FCM-UCSG*, 16(2), 16–23.
- Cogliati, M. (2013). Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, 2013, 23.
- Escandón, P., & Montilla, A. (2010). Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*. *Infectio*, 14, 127-130.

- Hasimoto e Souza, L. K., Costa, C. R., Fernandes, O. de F. L., Abrao, F. Y., Silva, T. C., Tremea, C. M., & Silva, M. do R. R. (2013). Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(3), 343-347. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0061-2012>
- Huston, S. M., & Mody, C. H. (2009). Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clinics in Chest Medicine*, 30(2), 253-264, vi. <http://doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.006>
- Imwidthaya, P., & Pongvarin, N. (2000). Cryptococcosis in AIDS. *Postgraduate Medical Journal*, 76(892), 85-88.
- Jain, N., Wickes, B. L., Keller, S. M., Fu, J., Casadevall, A., Jain, P., ... Fries, B. C. (2005). Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5733-5742. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5733-5742.2005>
- Kumar, S., Wanchu, A., Chakrabarti, A., Sharma, A., Bambery, P., & Singh, S. (2008). Cryptococcal meningitis in HIV infected: experience from a North Indian tertiary center. *Neurology India*, 56(4), 444-449.
- Mandell, Douglas, & Bennett. (2011). *Mandell, Douglas y Bennet Enfermedades infecciosas. Principios y práctica + acceso online*. (J. E. Bennett, R. Dolin, & J. E. Bennett, Eds.) (Séptima). Elsevier Health Sciences Spain. Recuperado a partir de <https://books.google.es/books?id=0bxvVsuYi58C>
- Mazuelos, E. M., & García, A. I. A. (2010). [Microbiological aspects of the cryptococcosis in the post-HAART era]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 28 Suppl 1, 40-45. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70007-0](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70007-0)
- Meyer, W., Castaneda, A., Jackson, S., Huynh, M., & Castaneda, E. (2003). Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 9(2), 189-195. <http://doi.org/10.3201/eid0902.020246>
- Mwaba, P., Mwansa, J., Chintu, C., Pobee, J., Scarborough, M., Portsmouth, S., & Zumla, A. (2001). Clinical presentation, natural history, and cumulative death rates of 230 adults with primary cryptococcal meningitis in Zambian AIDS patients treated under local conditions. *Postgraduate Medical Journal*, 77(914), 769-773.
- OMS, O. (2013). *ESTADÍSTICAS\_SANITARIAS\_MUNDIALES\_2014.pdf* (No. WHO/HIS/HSI/14.1). Suiza: WHO Document Production Services.
- 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. <http://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.73>
- Rivera, V., Gaviria, M., Muñoz-Cadavid, C., Cano, L., & Naranjo, T. (2015). Validation and clinical application of a molecular method for the identification of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex DNA in human clinical specimens. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(6), 563-570. <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.07.006>



- Sánchez, A., Escandón, P., & Castañeda, E. (2008). Determinación in vitro de la actividad de los factores asociados con la virulencia de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(3), 145-149. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70034-2](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70034-2)
- Satoh, K., Maeda, M., Umeda, Y., Miyajima, Y., & Makimura, K. (2011). Detection and identification of probable endemic fungal pathogen, *Cryptococcus gattii*, and worldwide pathogen, *Cryptococcus neoformans*, by real-time PCR. *Microbiology and Immunology*, 55(6), 454-457. <http://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00324.x>
- Sidrim, J. J. C., Costa, A. K. F., Cordeiro, R. A., Brilhante, R. S. N., Moura, F. E. A., Castelo-Branco, D. S. C. M., ... Rocha, M. F. G. (2010). Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(6), 445-458. <http://doi.org/10.1139/W10-030>
- SIISE. (s. f.). Recuperado a partir de [www.siise.gob.ec](http://www.siise.gob.ec)

Two species, *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*, are responsible for most clinical cases. *C. neoformans* is an opportunistic human pathogen, and primarily affects people who are immunosuppressed; however, this does not seem to be the case for *C. gattii* in humans, or for either organism in animals. Molecular types are mainly used in epidemiological studies of outbreaks. *C. neoformans* var. *grubii* contains types VNI and VNII, and *C. neoformans* var. *neoformans* is equivalent to type VNIV, while hybrids between *C. neoformans* var. *grubii* and *C. neoformans* var. *neoformans* are type VNIII. Other species of *Cryptococcus* Species other than *C. neoformans* and *C. gattii* have rarely been reported to affect animals. *C. albidus* was found.