



Frecuencia de serotipos de *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* en México

Palabras clave:

Serotipos,
Cryptococcus,
Criptococosis,
Frecuencia, México.

Key words:

Serotypes,
Cryptococcus,
Cryptococcosis,
Frequency, Mexico.

* Unidad de Micología Médica. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

† Laboratorio de Infectología. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Secretaría de Salud.

§ Laboratorio de Micología Médica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia:

Dra. en C. Laura Rosío Castañón Olivares.
Unidad de Micología, 2º piso, Depto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
Av. Universidad núm. 3000, Col. Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.
Tel: +52 (55) 5623-2459.
E-mail: lrcastao@unam.mx

Recibido:

04/04/2014.

Aceptado:

24/04/2014.

R López-Martínez,* E Córdova-Martínez,* E Bazán-Mora,* MA Mondragón-Ordóñez,* V Ángeles-Morales,† P García-Zaldívar,§ LR Castañón-Olivares*

RESUMEN

La criptococosis es causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* o *C. gattii*. Pocos estudios acerca de la subtipificación de los agentes causales han sido desarrollados en países latinoamericanos. Para conocer la presencia de los serotipos en nuestro país, se hizo un estudio descriptivo en el cual fueron estudiados 150 cultivos de *Cryptococcus* sp, provenientes de pacientes y proporcionados por dos hospitales de concentración en el Distrito Federal. Se obtuvieron los datos clínico-demográficos de los pacientes a partir de los cuales se efectuaron los aislamientos de las levaduras. La subtipificación de las levaduras se elaboró mediante pruebas bioquímicas y serológicas; los datos obtenidos fueron correlacionados. Todas las levaduras identificadas como *C. neoformans* fueron aisladas de pacientes con SIDA, mientras que los casos *C. gattii* se asociaron a pacientes aparentemente inmunocompetentes. Se encontró la siguiente distribución: serotipo A 83% (*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*); serotipo B 5% (*C. gattii*); serotipo D 5% (*C. neoformans* var. *neoformans*); serotipo AD 4% (*C. neoformans* híbrido) y serotipo C 3% (*C. gattii*). Los resultados corroboran al serotipo A como el agente etiológico de la criptococosis mayormente identificado y, a diferencia de otros países, en México el complejo *C. neoformans*/C. *gattii* muestra una evidente diversidad en serotipos.

ABSTRACT

Cryptococcosis in Mexico is mainly caused by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. Few studies on sub-types of causative agents have been developed in Latin American countries. For the presence of serotypes in our country, was made a descriptive study in which 150 *Cryptococcus* sp isolates were studied, from patients who provided by two hospitals in Mexico City. Clinical and demographic patients data, from which yeast isolates were recovered, were registered. The sub-type of yeast was identified by biochemical and serological tests, finally the data were correlated. All yeasts identified as *C. neoformans* were mainly isolated from patients with AIDS and other underlying disease, while *C. gattii* cases were associated with apparently immunocompetent patients. Was found the next distribution: 83% serotype A (*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*); serotype B 5% (*C. gattii*); serotype D 5% (*C. neoformans* var. *neoformans*); serotype AD 4% (hybrid *C. neoformans*) and serotype C 3% (*C. gattii*). The results corroborate the serotype A, as the principal etiologic agent of cryptococcosis identified and unlike other countries, in Mexico the *C. neoformans*/C. *gattii* complex, shows a clear diversity in serotypes.

INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una infección micótica con distribución mundial, causada por levaduras del género *Cryptococcus*, principalmente aquellas que integran al complejo *C. neoformans*/C. *gattii*.¹ En un estudio llevado a cabo en el año 2005, se estimó que la prevalencia de la criptococosis en personas diagnosticadas con meningoencefalitis en México era de 10%.² Datos más actuales muestran que la frecuencia de esta micosis ha variado poco, pero la incidencia depende del grupo poblacional estudiado; por ejemplo,

en pacientes con neuropatías diversas y SIDA, la criptococosis se presenta hasta en 28%;³ mientras que en enfermos neutropénicos con fiebre de etiología desconocida o en casos dermatológicos inmunodeficientes, la infección se presenta en 10 y 4.3%, respectivamente.^{4,5} En el campo epidemiológico, la mayoría de los estudios en nuestro país se han enfocado en la descripción clínica y el manejo terapéutico de los pacientes,²⁻⁵ por lo que son escasas las investigaciones relacionadas con la subtipificación de los agentes etiológicos;^{6,7} dato importante para definir la concentración, distribución geográfica y estacional de

éstas levaduras, con el fin de valorar la instauración de medidas profilácticas.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo mostrar la distribución, en cuanto a frecuencia, de especies, variedades y serotipos de las levaduras correspondientes al complejo *Cryptococcus* spp. aisladas de pacientes derechohabientes de dos hospitales ubicados en el Distrito Federal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los casos estudiados correspondieron a 150 aislamientos clínicos de *Cryptococcus* spp. provenientes de pacientes con criptococosis del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Secretaría de Salud y del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). De cada paciente se anotaron los datos de edad, sexo, factores de oportunismo y forma clínica de criptococosis.

Como cepas de referencia para todas las pruebas, fueron usadas cinco cepas caracterizadas genotípicamente y utilizadas en otras investigaciones (6-7): WM148 (serotipo A, genotipo VNI), WM628 (serotipo AD, genotipo VNIII), WM629 (serotipo D, genotipo VNIV), WM175 (serotipo B, genotipo VGIII) y WM779 (serotipo C, genotipo VGIV).

Todos los aislados (de pacientes y cepas de referencia) fueron analizados mediante el examen en fresco con tinta china y purificados mediante su cultivo en agar Níger (prueba de fenoloxidasas). Asimismo, se efectuó la siembra en agar urea de Christensen. Para conocer la especie, las levaduras fueron cultivadas en el medio de agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). La identificación del antígeno capsular polisacárido o serotipo, se realizó mediante la técnica de aglutinación con partículas de látex (APL) con el kit Crypto Check latron®RM 304-K (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokio, Japón),⁸ siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente: Cada aislamiento fue cultivado de 24 a 48 horas en agar dextrosa Sabouraud con 50 µg/mL de estreptomycin a 27 °C. La prueba de aglutinación se llevó a cabo en un portaobjetos de vidrio en el cual se colocó una gota de cada uno de los factores séricos: 1, 5, 6, 7 y 8 y una gota de solución salina, como control negativo. En cada gota de suero se mezcló una pequeña cantidad del cultivo crecido en agar Sabouraud. Se giró el portaobjetos suavemente con la mano por un minuto y se observó, en un máximo de dos minutos, si hubo o no aglutinación en alguno de los sueros. La fórmula de los sueros positivos definió el patrón de aglutinación y, consecuentemente, la identificación del serotipo.⁸

Los resultados de laboratorio fueron analizados junto con los registros clínico-demográficos para determinar si existía o no una correlación entre ambos grupos de datos.

Debido a que México, Argentina, Brasil y Colombia, son los países latinoamericanos que cuentan con el mayor registro de publicaciones relacionadas con la ecoepidemiología de la criptococosis,¹ se compararon los resultados de serotipificación de este estudio con las más recientes frecuencias publicadas en esos tres países.⁹⁻¹¹

RESULTADOS

De los 150 aislados estudiados, 118 correspondieron a hombres y 32 a mujeres (proporción 4:1); 60% de los casos estuvieron dentro del grupo de 21 a 40 años de edad. La historia clínica de los pacientes demostró que 119 (79%) padecían SIDA, 13 (9%) tenían como enfermedades de base alguna de las siguientes: tuberculosis pulmonar y tuberculosis meníngea, cirrosis, toxoplasmosis, diabetes mellitus, plaquetopenia; mientras que en 18 sujetos (12 %) no se refirió ningún factor de oportunismo. El 97% de los aislados provinieron de pacientes con cuadro clínico meningo-encefálico y fueron obtenidos a partir de la siembra de líquido cefalorraquídeo en agar dextrosa Sabouraud. Todos los cultivos mostraron al microscopio presencia de levaduras encapsuladas; asimismo, todos fueron positivos a la prueba de ureasas y a la de fenoloxidasas. En agar CGB, 139 (93%) de los aislados fueron identificados como *C. neoformans* y 11 (7%) como *C. gattii*. Los serotipos tuvieron la distribución mostrada en el *cuadro I*.

La mayoría de los cultivos de *C. neoformans*, 132, estuvieron asociados a pacientes diagnosticados con SIDA o alguna otra enfermedad de base y todos los cultivos de *C. gattii* se relacionaron con sujetos aparentemente inmunocompetentes. Los parámetros sexo y edad no influyeron en la distribución de los serotipos.

En México existen dos trabajos previos relacionados con el tema.^{6,7} En el *cuadro II* puede observarse que conforme más grande es la muestra, mayor es el número de serotipos encontrados; asimismo, el registro señala que, de los cuatro países comparados, México con el presente trabajo, tiene el mayor número de casos analizado.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en trabajos similares:^{1,6-7,9-11} 1) Existe predominio de *C. neoformans* sobre *C. gattii*; 2) el serotipo A correspondiente a *C. neoformans* var. *grubii* fue el subtipo serológico preponderante; 3) Existe una fuerte asociación entre los

Cuadro I. Distribución de las especies, variedades de especie y serotipos en 150 pacientes con criptococosis.

Especie y variedad de especie	Factores de oportunismo			Total	Serotipo	%
	SIDA	Otros	Sin			
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	109	10	6	125	A	83.3
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	7	1	-	8	D	5.4
<i>C. gattii</i>	-	-	7	7	B	4.7
<i>C. neoformans</i> híbrido	3	2	1	6	AD	4.0
<i>C. gattii</i>	-	-	4	4	C	2.6
Total	119	13	18	150		100.0

Cuadro II. Comparación de la frecuencia de serotipos *C. neoformans*/*C. gattii* de México con la obtenida en otros países de Latinoamérica.

Año	México			Argentina	Colombia	Brasil
	2003 ⁶	2009 ⁷	2013*	2002 ⁹	2007 ¹⁰	2010 ¹¹
Serotipo A	49	60	125	110	33	76
Serotipo B	19	7	7	2	13	5
Serotipo C	-	1	4	-	3	-
Serotipo D	-	1	8	5	4	-
Serotipo AD	1	3	6	3	-	-
Total	69	72	150	120	53	81

* Este estudio.

serotipos A, D, AD y pacientes con SIDA; 4) Hay una estrecha relación entre los serotipos B, C y sujetos inmunocompetentes.

Los datos obtenidos muestran que es indudable la preponderancia del serotipo A; sin embargo, en la frecuencia encontrada entre los serotipos B, D y AD no se observa una diferencia significativa. Independientemente de las frecuencias halladas, llama la atención el hallazgo de los cuatro principales serotipos y uno de los tres híbridos reportados en el mundo, del complejo *Cryptococcus*. Desde el punto de vista biológico los resultados conllevan a especular una biodiversidad inesperadamente amplia de los serotipos en nuestro país, tomando en cuenta que la procedencia de los pacientes se limita a la zona metropolitana de la Ciudad de México (Distrito Federal y algunas partes del Estado de México), lugar en donde las condiciones climáticas son poco diversas, ya que predomina el clima del tipo seco estepario.

Lo anterior puede en parte explicarse con los datos del *cuadro II*. Se aprecia que en Argentina, Brasil, Colombia y México, aunque con frecuencias diferentes, los cinco serotipos se encuentran distribuidos, independientemente de las condiciones climáticas prevalentes en cada uno de los países comparados; en otras palabras, la idea de que los serotipos tenían una asociación estrecha con la situación geográfica (serotipos B/C con regiones de climas lluviosos tropicales y serotipo D con zonas de clima oceánico templado), va cayendo en desuso con los descubrimientos iniciados en este nuevo siglo, en donde se ha mostrado que los serotipos tienen una distribución geográfica mundial, más amplia de lo conocido hasta la década de los noventa en el siglo pasado.¹ Todo lo anterior demuestra que la incidencia de algún serotipo en un lugar, es debido a factores ambientales, pero no asociados a tipo de clima, además de que es necesaria mayor acuciosidad para continuar la subtipificación de

Cryptococcus en diversos lugares del mundo y no conformarse con la identificación a nivel de género y especie.

Debido a la gran variabilidad observada en el complejo de especies de *Cryptococcus* y a que la subtipificación molecular ha ayudado a la correcta identificación de los agentes causales, las técnicas de serotipificación han caído en desuso y se han subestimado; sin embargo, debido a que los recursos moleculares no están siempre al alcance de los laboratorios de rutina, es justamente en ese tipo de laboratorios en que debería enfatizarse el uso de la serotipificación, cada vez que por cultivo, se haga el diagnóstico de criptococosis en los pacientes. De esta manera, aunque la tipificación no es tan específica como para, por ejemplo, discriminar a los híbridos, sin duda alguna brinda una información suficientemente útil dentro del campo epidemiológico de esta terrible micosis.

REFERENCIAS

1. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica* (Cairo). 2013; 2013: 675-213.
2. Barriga-Angulo G, Asumir- Escorza C, Mercado-González NF. Actualidades y tendencias en la etiología de las meningoencefalitis causadas por hongos y bacterias (1980-2004). *Rev Mex Patol Clin*. 2005; 52: 240-245.
3. Ramírez-Crescencio MA, Velásquez-Pérez L. Epidemiology and trend of neurological diseases associated to HIV/AIDS. Experience of Mexican patients 1995-2009. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013; 115: 1322-1325.
4. Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Cumplido-Urbe C, Hernández-Hernández F, Ramos-Hernández J, López-Martínez R. Micosis invasivas en pacientes inmunodeprimidos con fiebre de origen desconocido. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2012; 50: 609-614.
5. Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM, Hunderiker M, Bonifaz A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. *JDDG*. 2013; DOI: 10.1111/ddg.12097.
6. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. The Iberoamerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9: 189-195.
7. Castañón-Olivares LR, Martínez MK, Bermúdez-Cruz RM, Martínez-Rivera MA, Meyer W, Arreguín-Espinosa RA, López-Martínez R, Ruiz Palacios y Santos GM. Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Med Mycol*. 2009; 47: 713-721.
8. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 1982; 16: 22-29.
9. Canteros CE, Brudny M, Roderio L, Perrotta D, Davel G. Distribution of *Cryptococcus neoformans* serotypes associated with human infections in Argentina. *Rev Argen Microbiol*. 2002; 34: 213-218.
10. Escandón P, Ngamskulrungron P, Meyer W, Castañeda E. *In vitro* mating of Colombian isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Biomédica*. 2007; 27: 308-314.
11. Mora DJ, Pedrosa AL, Rodrigues V, Leite Maffei CM, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Silva-Vergara ML. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*. 2010; 48: 561-569.