



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DEL
COMPLEJO DE ESPECIES
Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii
EN MEXICO

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta: LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES

México, Distrito Federal

Diciembre 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en las siguientes instalaciones:

- **Laboratorio de Micología Médica. Facultad de Medicina, UNAM.**
- **Laboratorio de Biología Molecular. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, SS.**
- **Laboratorio de Micología Médica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas**
- **Laboratorio de Soluciones Genéticas S. A. de C. V., Tijuana, BC.**

Bajo la orientación y supervisión de:

COMITÉ TUTORAL

Médico Cirujano Arturo Rubén López Martínez

Doctor Roberto A. Arreguín Espinosa de los Monteros

Doctor Guillermo M. Ruiz Palacios y Santos

Y

Doctora Rosa María Bermúdez Cruz.
Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN.

Doctora María de los Ángeles Martínez Rivera.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

Maestro en Ciencias Don Diego Güereña Elizalde.
Laboratorio de Soluciones Genéticas, SA de CV. Tijuana, Baja California

AGRADECIMIENTOS

Primero y como más importante, me gustaría agradecer sinceramente a mi familia y a mis amigos su apoyo, consideración, paciencia, comprensión, ayuda en todo momento y sobretodo por sus dosis de amor durante el proceso de este trabajo.

Por supuesto y como no agradecer al Dr. Guillermo M. Ruiz Palacios y Santos, por su gran apoyo, sus conocimientos, orientaciones y manera de trabajar, que han sido fundamentales para mi formación como investigadora. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con él por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta tesis doctoral.

De igual forma agradezco al resto de mis tutores y profesores de mi *alma mater*, la UNAM y de otras instituciones, por su trato humano y su visión crítica, que me han ayudado como persona y profesionista.

Y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecida con mis compañeras y compañeros de trabajo, en la UNAM y en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Dr. Salvador Zurabián", SS, cuyos consejos y calor humano me han enriquecido.

¡Soy una mujer afortunada, por tenerlos a todos ustedes!

De todo corazón:

GRACIAS.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	
Ciclo de vida	9
Ecología	11
<i>Cryptococcus neoformans</i>	12
<i>Cryptococcus gattii</i>	13
Otras especies	14
Criptococosis	14
Factores de virulencia	16
Consenso MLST	17
Proyecto de la secuenciación del genoma	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
OBJETIVOS	20
HIPÓTESIS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	40
PERSPECTIVAS A FUTURO	41
REFERENCIAS	42
PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN	47

Palabras clave: Criptococosis, México, genotipificación, *C. neoformans*, *C. gattii*

ABREVIATURAS

ADN	=	Ácido DesoxirriboNucléico
ADS	=	Agar Dextrosa Sabouraud
AFLP	=	Polimorfismo en longitud de los fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polimorphysm)
CGB	=	Canavanina Glicina azul de Bromotimol
CGH	=	Hibridación genómica comparada (Comparative Genome Hibridization)
CLSI	=	Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (Clinical and Laboratory Standars Institute)
CMI	=	Concentración Mínima Inhibitoria
EDTA	=	Ácido etilendiamino tetra-acético (EtilenDiamin Tetra-acetic Ácid)
ELISA	=	Inmunoensayo enzimático (Enzyme Like-ImmunoaSsAy)
FP	=	Huella digital (Finger Printing)
FRET	=	Transferencia de energía fluorescente resonante (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
GXM	=	GlucoronoXyloManana
IGS	=	Secuencia intergénica (InterGenic Sequence)
ITS	=	Secuencia intertranscripcional (InterTranscriptional sequence)
LCR	=	Líquido CefaloRraquideo
MAPcinasa	=	Proteínas cinasas activadoras de mitógeno (Mitogen Activated Protein cinasas)
MLST	=	Tipificación por secuencias multi- <i>locus</i> (Multi Locus Sequence Typing)
PCR	=	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)
RAPD	=	Polimorfismo de la amplificación al azar del ADN (Random Amplified Polimorphysm Desoxirribonucleic acid)
RFLP	=	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción estriiction Fragment Length Polimorphysm)
SIDA	=	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
TBE	=	EDTA tris-boratos (Tris Borates EDTA)
TIGR	=	Instituto de la investigación genómica (The Institute for Genomic Research)
VIH	=	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VG	=	Variedad <i>Gattii</i>
VN	=	Variedad <i>Neoformans</i>

RESUMEN

Cryptococcus neoformans y *C. gattii*, son levaduras capsuladas ubicuas principalmente causantes de meningoencefalitis y que ponen en peligro la vida de pacientes que cursan con deficiencias en la defensa inmune mediada por células.

En casi todos los países del mundo, la criptococosis es una enfermedad que carece de notificación sanitaria, lo cual explica por qué a pesar de los pocos pero excelentes estudios epidemiológicos llevados a cabo en algunos países, no hay una estimación precisa de su prevalencia ni de la distribución de los genotipos (VG, variedad *gattii* y VN, variedad *neoformans*) de los agentes causales.

Por lo anterior, en el presente estudio se asumió como objetivo obtener una aproximación al conocimiento de la epidemiología de la criptococosis en México.

El proyecto se llevó a cabo en las siguientes etapas: 1) Investigación de la frecuencia de la enfermedad en nuestro medio, 2) Aislamiento de las levaduras a partir de fuentes naturales y de pacientes con criptococosis, 3) Estudio de la susceptibilidad antifúngica y finalmente 4) Identificación genotípica.

Al igual que en otros países los resultados obtenidos muestran que: 1) La criptococosis tiene mayor prevalencia en el sexo masculino que en el femenino, 2) La gran mayoría de los casos causados por *C. neoformans* var. *grubii*, están asociados a pacientes con SIDA, en quienes se presenta una alta tasa de muerte, 3) La mayor parte de las personas afectadas se encuentran entre la tercera y cuarta década de la vida, 4) Los casos causados por *C. gattii* están asociados a pacientes inmunocompetentes, 5) Los aislados muestran sensibilidad a la anfotericina B y a los azólicos, pero resistencia a caspofungina 6) Los genotipos designados como VNI y VNII son dominantes en los aislados clínicos.

A diferencia con otros estudios, nuestros resultados revelan que: 1) En cuanto a frecuencia, después de *C. neoformans* var. *grubii*, el agente que le sigue en orden descendente es *C. gattii* y es notable la escasa frecuencia con la que se presentaron casos por *C. neoformans* var. *neoformans*, 2) Los cuatro diferentes genotipos que integran a *C. gattii*, se encontraron en la misma frecuencia, 3) La presencia de pacientes con criptococosis causada por *C. gattii*, no estuvo relacionada con regiones de clima tropical y 4) En nuestro país, se encuentran representados los ocho genotipos formalmente descritos para estas levaduras.

El análisis y la discusión de los resultados nos llevan a concluir que: 1) Existe una buena correlación entre los resultados de las pruebas bioquímicas, el análisis serológico y los patrones genotípicos, 2) Las pruebas aplicadas reconocieron a cepas "atípicas" interesantes, cuya investigación posterior nos podrá dar información de la deriva génica de estas levaduras dentro del continente americano, dato importante para investigar la relación causa-efecto entre exposición y enfermedad, 3) Se estandarizaron las condiciones de las pruebas de sensibilidad anti-fúngica para *Cryptococcus* spp,

las que en el futuro nos permitirán monitorear el surgimiento de cepas resistentes, 4) De manera general encontramos que en México, la frecuencia entre los genotipos VN y VG es variable, pero su presencia no está asociada directamente al lugar geográfico, 5) México cobra una importancia relevante en el terreno epidemiológico ya que con la demostración de la presencia de los ocho genotipos, se afina la distribución geográfica mundial de los mismos, 6) Nuestros resultados permitieron generar patrones de 'huella digital' por PCR bajo condiciones estandarizadas en cepas mexicanas de *Cryptococcus* spp, por lo que dichos patrones "regionales" podrán ser usados como referencia y controles internos en estudios futuros acerca de la epidemiología en la criptococosis y 7) Es necesario continuar con el diseño de sondas específicas y reproducibles para identificar contundentemente a estos organismos en muestras biológicas de pacientes y contribuir al diagnóstico temprano.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans and *C. gattii*, are ubiquitous encapsulated yeast responsible for meningoencephalitis and life-threatening of patients with deficiencies in cell-mediated immune defense.

In almost all countries, cryptococcosis is a disease with few epidemiological studies therefore we ignore data like its prevalence, or distribution of genotypes (VG, variety *gattii* and VN, variety *neoformans*) of the causative agents.

Therefore, in this study the main objective was to obtain a better knowledge about the epidemiology of cryptococcosis in Mexico.

The project was carried out in the following stages: 1) Frequency research on cryptococcosis in our environment, 2) Isolation of yeasts from natural sources and from patients, 3) Study of the antifungal susceptibility and finally 4) Genotype identification.

The results showed: 1) The cryptococcosis is more prevalent in males than in females, 2) The vast majority of cases caused by *C. neoformans* var. *grubii* are related to AIDS patients, in whom there is a high death rate, 3) The majority of those affected are integrated between the third and fourth decade of life, 4) cases caused by *C. gattii* are associated with immunocompetent patients, 5) isolates show sensitivity to amphotericin B and azoles, but resistance to caspofungin 6) The genotypes VNI and VNII are prevalent in clinical isolates.

Different from other similar studies, our results showed: 1) *C. neoformans* var. *grubii*, is the most common agent of cryptococcosis, followed in decreasing order was *C. gattii* and it is remarkable the low frequency of *C. neoformans* var. *neoformans*, 2) the four different genotypes that integrate *C. gattii* were found in the same frequency, 3) the presence of patients with cryptococcosis caused by *C. gattii* was not related to tropical climates and 3) In our country, are formally represented the eight genotypes described for these species.

The analysis and discussion of the results lead us to conclude that: 1) There is good correlation between the biochemical and serological tests, with the genotype patterns, 2) Our methods recognized "atypical" strains which in further research may give us information about genetic drift within the American continent, 3) Were standardized antifungal susceptibility tests for *Cryptococcus* spp, which in future will allow us to monitor the emergence of resistant strains, 4) In general we find that in Mexico, the genotype frequency between VN and VG is variable, but its presence is not directly associated with geographic location, 5) Mexico charges relevant importance in the epidemiological field since the demonstration of the presence of the eight *Cryptococcus* genotypes, 6) Our results allow us to generate patterns of 'fingerprint' by PCR under standard conditions in Mexican *Cryptococcus* spp strains, and 7) Is necessary to continue with the search for designs and reproducible specific probes to identify these organisms in biological samples of patients and contribute to early diagnosis.

INTRODUCCIÓN

El género *Cryptococcus* está integrado por hongos levaduriformes caracterizados por ser encapsulados, gemantes, generalmente no formadores de pseudomicelio, sensibles a la cicloheximida y no fermentadores de azúcares [1-3]. El género *Cryptococcus* contiene 39 especies fúngicas heterobasidiomicetas, de las cuales *C. neoformans* y *C. gattii* son irrefutablemente consideradas como las especies patógenas para los mamíferos [1-6]. En el laboratorio es fácil diferenciar entre las dos especies patógenas con pruebas bioquímicas sencillas (Cuadro 1).

CUADRO 1. ALGUNAS DIFERENCIAS Y SEMEJANZAS ENTRE *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*

CARACTERÍSTICAS	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
Producción de ureasas	+	+
Reducción de nitratos a nitritos	-	-
Crecimiento a 37°C	+	+
Producción de laccasas (enzimas oxidativas)	+	+
Resistencia a la canavanina	-	+
Asimilación de la D-prolina	-	+
Inhibición de ureasas	-	+
Serotipos*	A y D	B y C
Teleomorfo	<i>Filobasidiella neoformans</i>	<i>Filobasidiella bacillispora</i>
Distribución mundial	amplia	restringida
Principalmente aislado de	excretas de aves	árboles de zonas no perturbadas
Patógeno	oportunista	primario
Huésped mamífero	inmunodeficiente	inmunocompetente

*Otros serotipos reconocidos como híbridos son: AD, AB, BD.

Microscópicamente, la mayoría de los criptococos aislados de especímenes clínicos aparecen como levaduras esféricas encapsuladas en tejidos y cultivo de los mismos. El tamaño de la cápsula varía de acuerdo con la cepa y las condiciones de cultivo, estimando que en la mayoría de los aislamientos tiene un tamaño promedio de 20 μm . La cápsula está formada principalmente por glucoronoxylomana [1-6].

Si bien el tamaño de la cápsula no es un criterio de identificación, la estructura espacial y la proporción de sus componentes permitieron clasificar convencionalmente a *C. neoformans* en cinco serotipos (A, B, C, D y el híbrido intra-variedad AD) y en tres variedades: *C. neoformans* var. *grubii*

(serotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C) [7-8].

En la última década, varias técnicas de biotipificación han sido usadas para conocer el genotipo de las levaduras y colaborar en el estudio de la epidemiología de la enfermedad que producen [9-13]. Un resultado de esos estudios fue la elevación a nivel de especie de *C. neoformans* var. *gattii* [7] basada en la variabilidad genómica y la falta de evidencia para la recombinación genética entre *C. neoformans* y *C. gattii*, además de las diferencias ya conocidas en caracteres fenotípicos, hábitat natural, epidemiología, manifestaciones clínicas de la enfermedad y respuesta al tratamiento antifúngico [1-6].

Principalmente a través de los patrones obtenidos con la PCR-“huella digital” (PCR-FP), generados con el iniciador “core” M13 [10] y la amplificación de fragmentos del gene *URA5* (orotidin-monofosfato pirofosforilasa) obtenidos por RFLP, mediante doble digestión con *Sau961* y *HhaI* [10], se considera que las especies *C. neoformans*-*C. gattii* forman un complejo integrado en ocho tipos moleculares o genotipos principales: *C. neoformans* var. *grubii* corresponde a los tipos moleculares VNI y VNII; *C. neoformans* var. *neoformans* corresponde al VNIV y el serotipo AD corresponde al genotipo VNIII. *C. gattii* está integrado por cuatro tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII y VGIV, los que se ha propuesto sean tratados como taxa diferentes (variedades) [14-18] (Fig. 1).

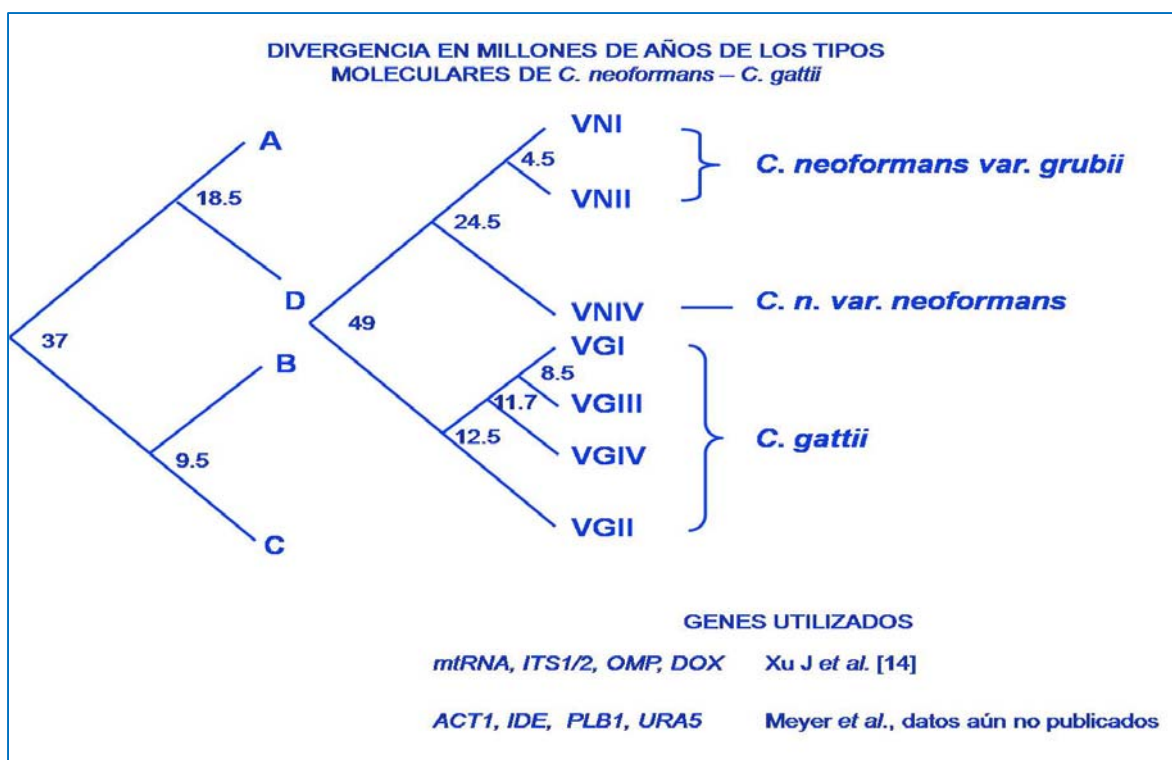


FIGURA 1. FILOGENIA Y DISTRIBUCIÓN EN SIETE GENOTIPOS DE *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii*.

Aún falta por acordar si el recientemente descrito genotipo VNB, característicamente asociado a aislados clínicos y ambientales de Botswana, es realmente un genotipo independiente o debe ser considerado como un subtipo del ya bien caracterizado genotipo VNII [16, 18] (Cuadro 2). Asimismo, la situación de identidad genotípica es incierta para aquellos aislados híbridos intra-específicos correspondientes a los serotipos BD y AB [17-18] (Fig. 2).

CUADRO 2. CONCORDANCIA DE DIFERENTES TIPIFICACIONES MOLECULARES USADAS PARA *C. neoformans*-*C. gattii* [16, 18, 36].

Serotipo	TÉCNICA (Autor)						
	FP (Meyer)	FP (Viviani)	AFLP (Boekhout)	AFLP (Litvintseva)	RFLP (Latouche)	IGS (Díaz)	ITS (Katsu)
A	VNI	VN6 (VN5)	AFLP1	VNI	A1	1A/B	ITS1
A	VNII		AFLP1a/AFLP1b	VNB		1A	ITS1
A	VNII	VN7	AFLP1a/AFLP1b	VNII	A2	1C	ITS1
AD	VNIII	VN3/VN4	AFLP3		A3	2C	ITS1/ITS2
D	VNIV	VN1 (VN2)	AFLP2		A4	2A/2B/2C	ITS2
B/C	VGI		AFLP4a/AFLP4b		A5	4	ITS3/ITS7
B/C	VGII		AFLP6		A6	3	ITS4
B/C	VGIII		AFLP5a/AFLP5b/ AFLP5c		A7	5	ITS5
B/C	VGIV		AFLP7		A8	6	ITS6

FP = Fingerprinting

AFLP = Amplified Fragment Length Polymorphism

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorfism

IGS = Inter Genic Sequence

ITS = Inter Transcription Sequence

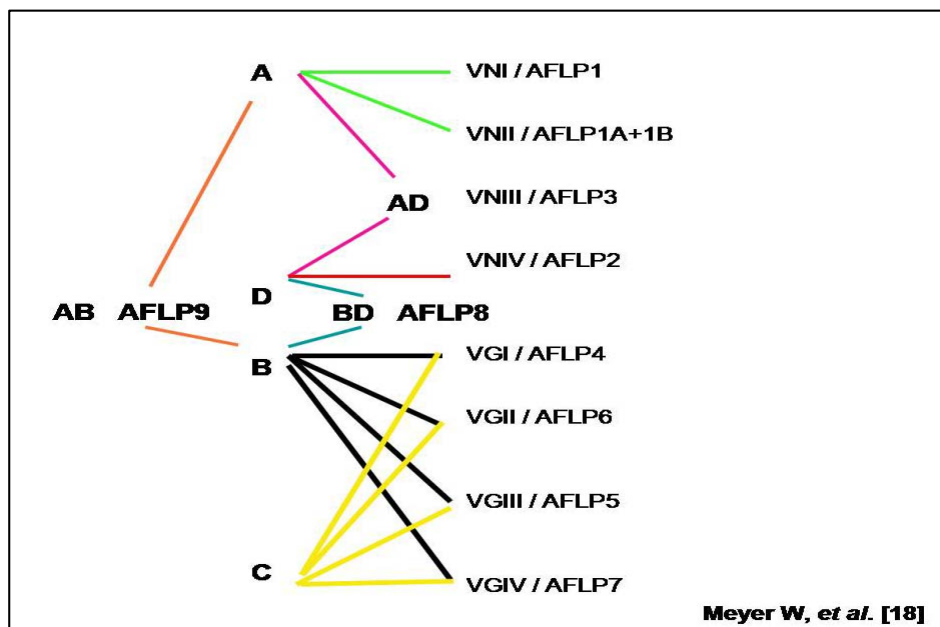


FIGURA 2. RELACIÓN DE LOS SEROTIPOS CON LOS GENOTIPOS PROPUESTOS PARA EL COMPLEJO *C. neoformans/C. gattii*.

ANTECEDENTES

Ciclo de Vida.

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* predominantemente existen como formas haploides vegetativas con reproducción asexual por gemación que son además heterotálicas, característica que les permite poseer un sistema de sexuado bipolar con los tipos sexuales **a** y **α** [1-2, 19-20]. El locus del tipo sexual (*MAT*) es la región del genoma fúngico que regula el ciclo sexual, las células de tipos sexuales opuestos se aparean para formar el teleomorfo filamentoso: *Filobasidiella neoformans* para el caso de *C. neoformans* o *F. bacillospora* el correspondiente a *C. gattii* (Fig. 3) [1-2, 14, 19-20].

Apareamiento sexual. En respuesta a la limitación de nutrientes, células levaduriformes **a** y **α** secretan péptidos-feromonas que disparan la fusión célula-célula. La fusión nuclear se retarda y el dicarion resultante inicia el crecimiento filamentoso. Los dos núcleos parentales migran coordinadamente en la hifa dicariótica y como cada septo formado separa las células, un núcleo es transferido a la penúltima célula hifal a través de una conexión "en pinza". En la etapa del desarrollo del basidio, los dos núcleos se fusionan y sufren meiosis para producir cuatro productos meióticos que sufren mitosis y geman desde la superficie del basidio para producir cadenas de basidiosporas (Fig. 3).

Fructificación monocariótica o haploide, fenómeno en el que exclusivamente se suscita la fusión nuclear, implica cepas del mismo tipo sexual por ejemplo células **α**, se transforman en diploides (**α/α**) tanto por endoduplicación como por fusión nuclear seguida de la fusión de dos células. Las hifas diploides monocarióticas forman conexiones "en pinza rudimentarias", las cuales no se fusionan a la célula precedida. En la etapa del desarrollo del basidio, la meiosis se presenta y basidiosporas haploides son producidas en cuatro cadenas. Se producen basidios con basidiosporas viables, aunque a una frecuencia más baja que en una cruce regular *MATa* x *MATα* [1-2] (Fig. 3). Este tipo de fructificación se ha observado con mucha mayor frecuencia en aislados *MATα* de todos los serotipos, que en los *MATa* [19-20].

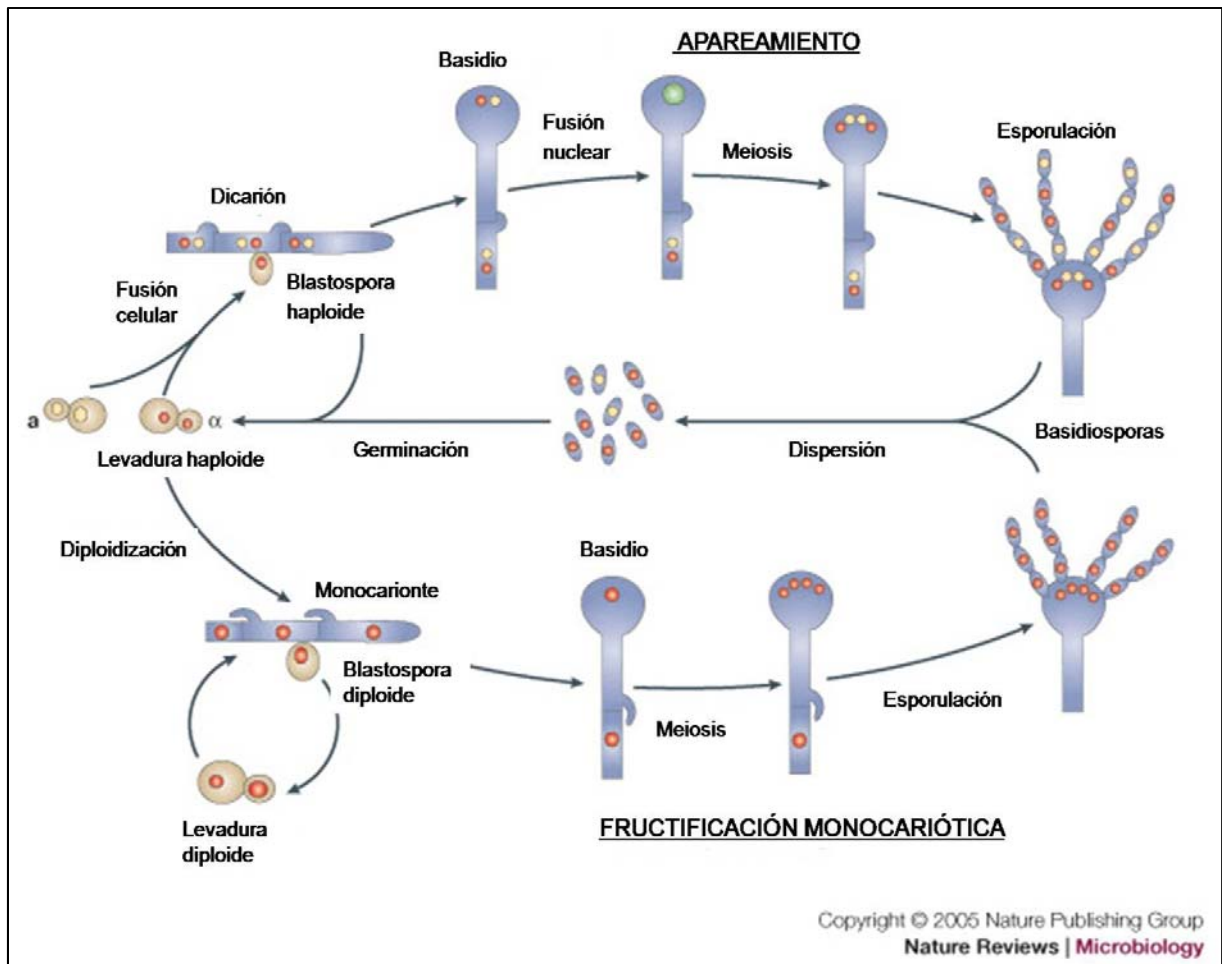


FIGURA 3. REPRODUCCIÓN EN *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.

El *locus MAT* en *C. neoformans/C. gattii* mide ~100 kb y codifica más de 20 genes esenciales, incluyendo aquellos que establecen la identidad del tipo celular, los implicados en la producción de feromonas (*MFa* y *MFa*), sensibilidad, componentes de la cascada MAPcinasa, así como algunos otros que no parecen tener función alguna en el sexado [19-20].

El apareamiento entre *C. neoformans* o *C. gattii* ha sido efectuado bajo condiciones de laboratorio y ocasionalmente se ha encontrado de manera natural; sea *in vitro* o en la naturaleza, el fenómeno de recombinación es evidente [14-17].

Asimismo, se han encontrado aislados diploides o aneuploides tales como los serotipos híbridos AD, BD o AB, los cuales generalmente poseen ambos *loci* del tipo sexual lo que indica que son resultado del apareamiento entre aislados de tipos sexuales opuestos, seguido de una meiosis dañada debido a las incompatibilidades genómicas. Se postula que los híbridos resultan de una esporulación premeiótica o a partir de la fusión de núcleos meióticos haploides seguidos por el empaquetamiento de

núcleos diploides en una basidiospora. Apoyando esa teoría, se han observado basidios atípicos produciendo dos esporas normales y una espora con núcleo diploide [19].

C. neoformans y *C. gattii* se reproducen mediante diversas estrategias sexuales y asexuales, en las cuales pueden presentarse tanto la recombinación como la dispersión clonal, lo que consecuentemente permite en estas especies una alta complejidad genotípica y quizá mayor probabilidad de sobrevivencia.

Ecología.

Se ha postulado que *C. neoformans* y *C. gattii* pueden ser hongos semejantes a tizones o levaduras endo/epífitas que desarrollan una asociación biotrófica específica con una planta huésped. En el caso de *C. gattii*, se postula que las teleutosporas o micelio dicariótico 'hiberna' en los ovarios o anteridios de retoños desarrollados de *Eucalyptus camaldulensis*. Con el florecimiento de la planta, las estructuras germinan para producir basidiosporas que son liberadas en el ambiente: las que quedan sobre el tejido meristemático del vegetal inician la formación de micelio dicariótico y, consecuentemente, la infección del tejido vegetal; las que se encuentran en el aire-ambiente permanecen por tiempos cortos, se dispersan y son propágulos infecciosos para el humano y otros animales. Después de la propagación esas esporas pueden sintetizar material capsular y transformarse en levaduras capsuladas [1, 21].

Las aves que tienen una asociación con el vegetal huésped pueden albergar a los criptococos a través de su intestino y depositar levaduras capsuladas en sus heces; los criptococos pueden acumularse en cobertizos (hábitats protegidos), los cuales actúan como fuentes importantes para la dispersión de otro tipo de propágulos infecciosos: las levaduras desecadas [1, 21-22].

En concordancia con los antecedentes ecológicos mencionados, se ha establecido que el hábitat natural de *C. neoformans* es también una planta que sería más semejante a hierbas o cereales comunes con los cuales las aves, especialmente las palomas, se alimentan. Otros estudios acerca de la interacción hospedero-parásito están en progreso para determinar dónde ocurre la formación de los elementos hifales dicarióticos y basidios del hongo en los vegetales huéspedes [1, 21].

Los criptococos son rápidamente eliminados del ambiente por la acción de los rayos solares y microorganismos tales como bacterias y amibas; sin embargo, si los criptococos son acumulados en cobertizos, pueden permanecer viables durante largos períodos (varios años) en el suelo o detritos orgánicos [1, 21].

Tanto las basidiosporas como las levaduras son células haploides, pero las levaduras son unidades vegetativas que crecen rápidamente sobre medios de cultivo artificiales.

Cryptococcus neoformans.

Con algunas excepciones, *C. neoformans* normalmente infecta pacientes inmunocomprometidos. Puede ser aislado del ambiente de cualquier lugar del mundo, es un patógeno ubicuo y está frecuentemente asociado con materias fecales aviarias, madera en putrefacción o suelo [1-3, 23-26]. La mayoría de los aislamientos de *C. neoformans* son var. *grubii* (serotipo A) y en menor frecuencia var. *neoformans* (serotipo D) [10-13]. Una propuesta reciente es que esas variedades deberían ser tratadas como especies diferentes debido a que han divergido lo suficiente (desde hace 18 millones de años, Fig. 1) para que un apareamiento normal no pueda ser posible. La comparación de sus genomas muestra que, entre estas dos variedades, no existen recientemente intercambios de ADN importantes [2, 14].

El serotipo A es responsable del 95% de todas las infecciones causadas por *C. neoformans* en pacientes. Ha sido subdividido en tres tipos moleculares: VNI (AFLP1), VNII (AFLP1B) y VNB (AFLP1A) (Cuadro 2). VNI es el tipo molecular más común e integra el 78% de los aislados de *C. neoformans* [10, 16-17]. El grupo VNB, inicialmente restringido a Botswana, recientemente ha sido recuperado de excrementos de palomas en Brasil y de pacientes de Ruanda, Portugal y Brasil, lo que ha dividido al genotipo en tres subgrupos: VNB-A, VNB-B y VNB-C. Las cepas serotipo A MAT_{α} (A_{α}) han mostrado ser más patógenas que las cepas A_a . Es interesante que el grupo VNB incluye una gran proporción de aislados fértiles de MAT_a [16].

Las cepas serotipo D se encuentran en todo el mundo pero son prevalentes en áreas con climas templados, como las de los países europeos, donde el 30% de los aislados pertenecen a este serotipo. Esta distribución restringida puede ser debida al hecho de que las cepas del serotipo D son más sensibles a altas temperaturas. Se ha reportado que el serotipo D es menos virulento y más sensible al fluconazol que las células serotipo A. Las manifestaciones clínicas de las infecciones humanas causadas por los serotipos A y D son similares. En modelos murinos, cepas D_{α} son más virulentas que sus congénicas D_a [27-28].

El serotipo AD es relativamente común y es el resultado de la fusión eventual entre cepas serotipo A y serotipo D. Un análisis de poblaciones ambientales y clínicas de *C. neoformans* en América del norte reveló que, aproximadamente, el 75% de las cepas aisladas del ambiente son híbridos AD [10-13]. Cepas $A_{\alpha}D_a$ han sido reportadas como más virulentas que las cepas A_aD_{α} y el genotipo híbrido $A_{\alpha}D_{\alpha}$ ha sido recientemente recuperado de EUA e Italia, confirmando el apareamiento entre sexos iguales α/α dentro de la misma especie [20, 27-28]. Se postula que las cepas serotipo AD aisladas en el mundo tienen su origen en África [16].

Cryptococcus gattii

Este organismo infecta principalmente individuos sin defectos inmunológicos [29], aunque se han reportado infecciones por *C. gattii* asociadas a pacientes con SIDA [30]. Se considera que *C. gattii* es la causa de criptococomas y tiene una menor sensibilidad a varios agentes antifúngicos, por lo que es necesaria una terapia prolongada en el paciente y es causa de una tasa de mortalidad alta [1-2, 31]. Ha sido consistentemente aislado de madera en descomposición de varias especies de árboles, especialmente de aquellas pertenecientes al grupo *Eucalyptus* spp [21-22, 32-33]. Se pensó inicialmente que la distribución geográfica de *C. gattii* estaba limitada a regiones tropicales o sub-tropicales del mundo; sin embargo, estudios recientes y el reporte del brote en la Isla Vancouver han revelado una distribución mucho más amplia de esta especie. Se considera que las cepas VGI (AFLP4) son las de mayor distribución mundial. Las cepas VGII (AFLP6) predominan en regiones de Australia y EUA, el genotipo VGIII (AFLP5) en países ibero-americanos y en la India, mientras que el tipo VGIV ha sido asociado con infecciones en pacientes VIH positivos encontrados en Sudáfrica y en América Central [31, 33-34].

Hasta hace poco, *C. gattii* había sido poco estudiado debido a que sólo representaba al 1% de las infecciones en los casos mundiales de criptococosis; sin embargo, el brote epidémico de criptococosis causado por *C. gattii* registrado en 1999 en la Isla Vancouver (Columbia Británica, Canadá) ha estimulado la investigación a detalle de este organismo. En esta isla poco más del 97% de los aislamientos criptococales se han identificado como del tipo molecular VGII y el resto, VGI [34]. En Columbia Británica, entre los años 2002 y 2006, el promedio anual de la incidencia de criptococosis fue de 6.5 casos/millón y 27.9 casos/millón en Isla Vancouver. Además de las infecciones humanas, la micosis ha sido diagnosticada en animales como perros, gatos, caballos y marsopas; de hecho, los casos veterinarios han sido reportados de dos a tres veces más frecuentemente que los casos humanos. Esto significa que el hongo ha infectado a más de 176 individuos y se ha diseminado de Isla Vancouver a otras regiones del noroeste del Pacífico de EUA y Canadá [31, 34].

Dentro de los aislados VGII se han identificado dos subtipos: una forma común principal en aislados clínicos y ambientales (VGIIa/AFLP6a, hipervirulento) presente en el 87% de los casos humanos y el 78% de los veterinarios, y un tipo raro presentado en un aislado clínico y varias muestras ambientales (VGIIb/AFLP6b, virulento atenuado). El análisis de genealogía por MLST (Multi Locus Sequence Typing) reveló que las cepas VGIIa y VGIIb encontradas en Isla Vancouver presentan genotipos similares o idénticos con otros aislados de otras partes del mundo, lo que hace difícil asegurar y determinar un origen específico. Las hipótesis actuales son: 1) Las especies han sido residentes en Columbia Británica desde hace mucho tiempo (población ancestral) ó 2) Las especies representan un genotipo particularmente virulento que pudo estar bien adaptado a condiciones locales y ha sido introducido recientemente a Columbia Británica [17, 31, 34].

Después de examinar 30 alelos de cepas VGIIa y VGIIb de la Isla Vancouver, se observó que muestran 14 *loci* idénticos y se hipotetiza que los aislamientos VGIIa podrían ser el resultado de un apareamiento del mismo sexo (α/α), entre un aislamiento VGIIb y un segundo aislamiento VGII desconocido, en tránsito en Australia o en el Pacífico noroeste [34]; sin embargo, se ha revelado que desde 1986 han sido recuperados aislamientos VGIIa y VGIIb en América del Sur, lo que sugiere que, más que haber sido el resultado de una recombinación reciente estos genotipos han estado presentes desde hace mucho tiempo en América [17].

Semejante a lo que ocurre en *C. neoformans*, en los aislados clínicos y ambientales el tipo sexual *MAT α* de *C. gattii* es predominante y a partir de muestras clínicas han sido descritos híbridos *C. gattii* x *C. neoformans* (serotipos AB y BD), en los cuales los alelos de *C. gattii* provienen del tipo molecular VGI [35-37].

Otras especies.

Además de *C. neoformans* y *C. gattii*, hay por lo menos otras 37 especies más que integran al género, las cuales se encuentran en diversos ambientes como la Antártida, los Himalayas y aguas salobres [1]; sin embargo, ya que la mayoría de ellas no son capaces de sobrevivir en tejidos de mamíferos, debido a la relativamente alta temperatura corporal y al sistema inmune del huésped, la infección causada por estas especies es rara [28]. Se considera que de las criptocosis no causadas por *C. neoformans* y *C. gattii*, el 80% de ellas son debidas a *C. laurentii* y *C. albidus*. Aunque el nivel de actividad de las laccasas es menor en éstas especies, la transmisión, los factores de virulencia y la respuesta inmune del huésped, son muy parecidos a los que se muestran en infecciones debidas por *C. neoformans*-*C. gattii* [1-2].

Criptococosis.

C. neoformans puede causar infecciones humanas seguidas a la inhalación de pequeños propágulos aéreos (basidiosporas o levaduras escasamente encapsuladas), encontrados en el suelo y el aire de ciertos ambientes como hábitats de aves o bosques de eucaliptos [1, 3, 21, 28]. Esto implica que, invariablemente, el pulmón es el portal de entrada y el sitio inicial de la infección. *C. neoformans* tiene la habilidad de sólo colonizar el tracto respiratorio del huésped inmunocompetente sin causar enfermedad, pero también es capaz de diseminar a cualquier órgano del cuerpo humano, con predilección por el sistema nervioso central. La meningoencefalitis representa la forma más severa de la enfermedad en el huésped inmunocomprometido y generalmente es fatal si no es tratada [1, 3].

Seguido a la inhalación de partículas infecciosas se forma un complejo pulmonar-linfático. En la mayoría de los casos no se desarrollan síntomas, lo que indica que la mayoría de las personas inmunocompetentes eliminan o controlan la infección antes de que la diseminación sistémica se

presente. Sin embargo, la levadura puede permanecer en un estado latente, quizá dentro del complejo nódulo-linfático y en aquellos pacientes con alteraciones significativas en su inmunidad como las que resultan de una administración prolongada de corticoesteroides, enfermedades hematológicas o infección por VIH, la diseminación de la enfermedad es frecuente [1, 3, 38].

Cryptococcus también puede causar infección localizada en piel, ojos, miocardio, huesos, articulaciones, pulmones, próstata, tracto urinario, sistema nervioso central y prácticamente en cualquier tejido [1, 3, 35-45]. Existe evidencia de que la diseminación es debida a una reactivación de la enfermedad latente, así por ejemplo, se han analizado aislamientos clínicos de *Cryptococcus gattii* recuperados de pacientes nacidos en África que han vivido en Francia por aproximadamente 10 años y no han tenido contacto con el ambiente africano por lo menos durante 13 años. En estos casos los patrones genéticos mostrados por RAPD son significativamente diferentes a los de otros pacientes europeos, lo que sugiere que *Cryptococcus* puede ser adquirido mucho antes de que la infección se desarrolle [38-39].

La criptococosis se presenta en mamíferos, pero la transmisión hombre-hombre o animal-hombre no ha sido documentada. También se sabe de ejemplos raros de transmisión iatrogénica y de madre-hijo [2].

La presentación clínica de la criptococosis puede ser aguda o crónica y las manifestaciones varían dependiendo del estado de la enfermedad. Los síntomas típicos asociados con meningoencefalitis son: presión elevada del líquido cefalorraquídeo (>250 mm H₂O) la que se ha presentado en más del 50% de pacientes con VIH asociados a meningitis criptococal y provoca dolor de cabeza, fiebre, estado mental alterado, pérdida de la visión, demencia e inclusive, coma [1, 3, 38-44]. En la criptococosis pulmonar, los síntomas varían desde nódulos pulmonares asintomáticos hasta síndrome pulmonar agudo; los síntomas más frecuentemente reportados son: tos (58%), disnea (46%) y fiebre (38%) [39-40].

C. neoformans y *C. gattii* afectan los pulmones y el sistema nervioso central; sin embargo, las infecciones causadas por estas dos especies tienen importantes diferencias en epidemiología, presentación clínica, y resultado terapéutico. Así, por ejemplo, *C. gattii* invade el parénquima cerebral más comúnmente que *C. neoformans* y *C. gattii* forma más frecuentemente criptocomas en pacientes con infección pulmonar [34, 39-40].

Desde 1981, las infecciones debidas a *Cryptococcus* han sido la causa mayor de morbilidad y mortalidad en individuos con sistema inmune deprimido como consecuencia del SIDA: del 5 al 10% de todos los individuos con linfopenia en CD4⁺ desarrollan criptococosis fatal [1-3, 10-13, 16, 22, 41]. Aunque la prevalencia de la criptococosis en individuos infectados con VIH ha declinado debido a la muy activa terapia antirretroviral, actualmente en el mundo la criptococosis es una de las tres infecciones oportunistas más comunes, al lado de la candidosis y neumocistosis (comunicación personal del Dr. Rubén López Martínez) que amenazan la vida de los pacientes con VIH-SIDA. Esta

enfermedad permanece epidémica en África y el sureste de Asia, donde más del 30% de los pacientes con VIH-SIDA son afectados [16]. La criptococosis ha sido reconocida en áreas definidas por VIH-SIDA como Zimbabue donde el 91% de los pacientes [16] están infectados con *Cryptococcus*. Aunque menos común, la criptococosis en pacientes VIH negativos también tiene una tasa alta de mortalidad [12, 45] (Cuadro 3).

CUADRO 3. PREVALENCIA DE CRIPTOCOCOSIS EN PACIENTES VIH POSITIVOS EN VARIOS PAÍSES DEL MUNDO.

ÁREA GEOGRÁFICA	AÑO	FRECUENCIA (%)
Estados Unidos de América [1]	1985	7.5
Países de África [1]	1994	6.0 – 12.0
Australia [1]	1995	5.5
Francia [1]	1996	4.8 – 7.8
Reino Unido [1]	1993	4.0
México [61]	2000	10.0 – 15.0
Brasil [12]	2010	62.7
Cuba [31]	2010	29.0

Factores de virulencia

Aunque *Cryptococcus neoformans /gattii* son patógenos de mamíferos, el huésped humano es un encuentro accidental y no su nicho primario. La infección de macrófagos y amibas por *C. neoformans /gattii* es muy similar y por lo tanto, ha sido postulado que más que factores de virulencia elaborados en contra del huésped implican, más bien mecanismos de defensa para sus depredadores ambientales naturales [46]. Cualquiera de esas dos situaciones, al igual que en otros hongos, se conoce que, son varios los procesos fisiológicos que podrían figurar como factores de virulencia [1, 2, 28]. En *C. neoformans/gattii* las características que más se han estudiado como factores de virulencia son la presencia de la cápsula polisacárida y la producción de melanina [8, 47, 48]. Otros parámetros que pudiesen estar relacionados con la patogenicidad de este hongo son: la capacidad de crecimiento a 37°C, enzimas (proteinasas, fosfolipasas, ureasas), el tipo sexual, el fenotipo “prendido o apagado”, la biosíntesis de adenina, la producción de manitol y la presencia de myristoil-transferasas [1, 2, 49] (Cuadro 4).

CUADRO 4. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE *Cryptococcus* spp RELACIONADAS CON VIRULENCIA.

FENOTIPO	EFFECTOS
Cápsula de glucoronoxylomanana	Inhibe la fagocitosis, resiste la digestión en fagosomas, causa disfunción y lisis en macrófagos, inhibe la migración de neutrófilos, interfiere con la secreción de opsoninas, inhibe la proliferación de células T, induce apoptosis en los macrófagos y retrasa la maduración y activación de células dendríticas.
Síntesis de melanina	Protege a la célula fúngica del ataque del sistema inmune, pues le confiere resistencia a compuestos oxidantes y a la fagocitosis. Asimismo, las células se protegen contra la caspofugina y anfotericina B.
Capacidad de crecer a 37°C	Su capacidad para crecer a temperatura fisiológica es determinante para el despliegue de patogenicidad.
Enzimas degradantes	Proteinasas y fosfolipasas dañan la membrana de los fagosomas. Otras proteinasas degradan: colágeno, elastina, fibrinógeno, inmunoglobulinas y factores del complemento. Las ureasas permiten el secuestro de las levaduras en microcapilares durante la diseminación hematológica y facilitan la transmisión sangre-cerebro.
Tipo sexual	La reproducción entre organismos del mismo sexo, provee una ventaja en la sobrevivencia del hongo. Aparentemente las células MAT α son más virulentas que las MAT α debido a que las primeras prefieren la invasión al sistema nervioso central.
Fenotipo "encendido-apagado" (switching)	Le permite a la levadura "mimetizarse", adaptarse al ambiente del huésped y evadir el reconocimiento por parte del sistema inmune.

Un estudio reciente demostró que *C. neoformans* es capaz de secretar vesículas que contienen varios de sus factores de virulencia, incluyendo glucoronoxylomanana –GXM-, laccasa, ureasa y fosfolipasa B. Las vesículas extracelulares mostraron varios tamaños y formas que incluyen cuerpos de membrana electro-lúcida y vesículas electro-densas. Durante la criptococosis diseminada se han podido medir niveles de productos metabólicos criptococales, los que han sido identificados en fluidos corporales de pacientes. Esto sugiere que esas "bolsas repartidoras de factores de virulencia" pueden representar una vía eficiente y general para "liberar" moléculas relacionadas con patogénesis en el ambiente extracelular de *C. neoformans/gattii* [2].

Consenso Multi-Locus Sequence Typing (MLST).

Debido a la falta de referencias-cruzadas, la correlación entre los resultados obtenidos por diferentes métodos genotípicos de sub-tipificación de *C. neoformans /gattii* ha dado como resultado que el genotipado de este importante patógeno humano no tenga una nomenclatura homogénea, por lo que se han asignado varios subgrupos según la referencia de los autores.

Reconociendo la urgente necesidad universal para estandarizar un método de tipificación, en el año 2007 fue formado el Grupo de Trabajo Genotyping of *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, bajo el cobijo de la International Society of Human and Animal Mycology. El grupo seleccionó el MLST como el método de elección para la tipificación de futuras cepas, por su poder discriminatorio y reproducibilidad entre diferentes laboratorios. El consenso del esquema MLST ha sido establecido usando siete *loci* genéticamente diferentes para genotipificar mundialmente cualquier aislado de *Cryptococcus neoformans* / *gattii*. Estos *loci* incluyen los genes estructurales (housekeeping de cápsula, laccasas, superóxido dismutasas, pirofosforilasas): *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* y la región IGS1. La información acerca del tipo de alelos y secuencias están accesibles en <http://www.mlst.net/> [18].

Proyecto de la secuenciación del genoma.

La secuencia genómica de cinco cepas de *Cryptococcus* (JEC21 y B3501A –*C. neoformans* var. *neoformans*, H99 –*C. neoformans* var. *grubii*-, WM276C y R265 –ambas *C. gattii*-) ha sido completada. El genoma de JEC21 (secuenciado por TIGR) comprende un total de 20 Mb de ADN y contiene aproximadamente 6,572 genes, 10% de los cuales son exclusivos de *C. neoformans*. El genoma, rico en intrones, codifica un transcriptoma abundante empalmado alternadamente (4.2% del transcriptoma) y mensajes antisentido (53 genes) [50]. El genoma es también rico en transposones (~5%), varios de los cuales forman agregados en regiones centroméricas. La presencia de estos transposones confiere una plasticidad genética y puede ser responsable de la inestabilidad en el cariotipo y variación fenotípica, lo cual se aprecia en el 50% de la diferencia en la secuencia de los genomas de JEC21 y B3501A [51].

Las secuencias completas de *C. neoformans* y *C. gattii* permitirán la genómica comparativa con hongos de otros *phyla* y entre los mismos cinco genomas criptococales. Además, la disponibilidad de estas secuencias ha hecho posible la construcción de microarreglos registrados y estudios de CGH (Comparative Genome Hybridization) [52].

La CGH en combinación con el mapeo físico y la secuenciación ha sido usada para estudiar la variabilidad genómica dentro de las especies de *C. neoformans* y potencialmente permitir, en el futuro, una caracterización detallada del genoma de cepas emergentes y clínicamente significativas. Estos estudios proveerán información importante sobre los mecanismos de la microevolución del genoma en estos patógenos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La criptococosis humana es una infección micótica con amplia distribución mundial y clínicamente severa en huéspedes inmunocomprometidos [1, 25, 30]. En el año 2002, el anamorfo conocido hasta entonces como *Cryptococcus neoformans* fue dividido en dos especies: *C. neoformans* variedades *grubii* y *neoformans* (serotipos A y D) y *C. gattii* (serotipos B y C). Ambas especies son ahora reconocidas como los principales agentes etiológicos de la criptococosis [7].

En México la criptococosis es causada por ambas especies [25]. En un estudio efectuado en el Centro Médico Nacional La Raza se encontró que en 282 de 2,940 casos de meningoencefalitis (en el periodo 1980-2004), la causa del padecimiento fueron hongos del género *Cryptococcus* [41].

Debido a que la criptococosis tiene una alta mortalidad (40% de los enfermos con SIDA mueren por causa de *Cryptococcus*), diversos estudios se han dedicado a conocer más la biología del agente etiológico con objeto de desarrollar métodos eficaces para identificar a la enfermedad en sus etapas iniciales y así proponer recomendaciones de prevención y terapia efectivas. Entre estos métodos se encuentran los de sub-tipificación, que han sido ampliamente utilizados en estudios epidemiológicos.

Para sub-tipificar cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* las técnicas más utilizadas son morfológicas, bioquímicas y de análisis del ADN [10-13]. Entre estas últimas, se han desarrollado investigaciones de variabilidad genética para dar respuesta a varias interrogantes epidemiológicas. Principalmente destacan los intentos por correlacionar los patrones genéticos de cepas ambientales con las provenientes de pacientes para reconocer la fuente de infección, con la premisa de que la enfermedad podría prevenirse y evitar muertes prematuras.

Con esta información, se inició una investigación básica que contribuyera al conocimiento epidemiológico de la criptococosis en México. Por ello, la finalidad del presente trabajo es conocer los biotipos y de manera particular, la diversidad genética de *C. neoformans* y *C. gattii* en México.

OBJETIVOS

Principal

Identificar los biotipos de los agentes causantes de la criptococosis humana en México

Particulares

- Estimar la frecuencia de los agentes causantes de criptococosis en México.
- Aislar a *Cryptococcus gattii* a partir de fuentes naturales.
- Investigar la susceptibilidad a antifúngicos de aislados de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*.
- Identificar los principales genotipos de *Cryptococcus* spp, causantes de infección en el humano.
- Elaborar un método que discrimine a *C. gattii* de *C. neoformans* y dentro de esta última especie, a *C. neoformans* var. *grubii* de *C. neoformans* var. *neoformans*.

HIPÓTESIS

En México la criptococosis no es una enfermedad considerada como de notificación obligatoria, por lo cual poco interés epidemiológico ha despertado entre las autoridades sanitarias. Actualmente nuestro país se encuentra en proceso de transición epidemiológica, por lo que suponemos que la criptococosis sea una micosis prevalente, cuyos agentes causales se encuentran en una diversidad amplia de biotipos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante todo el desarrollo de la investigación, fueron utilizadas ocho cepas de referencia, gentilmente donadas por el Dr. Wieland Meyer (Cuadro 5).

CUADRO 5. DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS DE REFERENCIA

CLAVE DE LA CEPA	ORIGEN	SEROTIPO	GENOTIPO
WM 148	Australia	A	VNI
WM 626	Australia	A	VNII
WM 628	Australia	AD	VNIII
WM 629	Australia	D	VNIV
WM 179	Australia	B	VGI
WM 178	Australia	B	VGII
WM 175	E.U.A.	B	VGIII
WM 779	Sudáfrica	C	VGIV

Estimación de la frecuencia de *Cryptococcus* spp aislados de casos clínicos.

Los cultivos fueron obtenidos de pacientes internados en diferentes hospitales ubicados en el Distrito Federal (Cuadro 6), cada uno de los cuales proporcionó el producto patológico del paciente (principalmente esputo y líquido cefalorraquídeo) o el cultivo obtenido de la siembra de los especímenes de los individuos diagnosticados con criptococosis.

Los expedientes clínicos de los pacientes fueron revisados para obtener algunos datos demográficos y clínicos: nombre, sexo, edad, ocupación, lugar de residencia, lugar de origen, producto patológico examinado y enfermedad de base.

CUADRO 6. HOSPITALES DE DONDE PROVINIERON LOS AISLADOS CLÍNICOS ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO

HOSPITAL	No. DE AISLADOS PROPORCIONADOS
Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS	114
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SS	65
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS	14
Hospital Juárez, SS	4
Hospital Ignacio Zaragoza, ISSSTE	6
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, SS	3
Instituto Nacional de Pediatría, SS	2
Otros hospitales	3
Total	211

Identificación morfológica, bioquímica y serológica

Las levaduras fueron identificadas inicialmente como *Cryptococcus* a través de un examen directo con tinta China y observando al microscopio la presencia de cápsula, la que se midió con una reglilla ocular de 10 mm de longitud, dividida en 100 partes. Los productos biológicos fueron sembrados en agar dextrosa Sabouraud (ADS) sin cicloheximida (Actidiona®) e incubados a 30 y 37°C y se registraron los datos acerca de la presencia o ausencia de la cápsula, el tamaño de la misma en el espécimen analizado, así como el aspecto macroscópico de la colonia, en cada aislado. La identidad de género se confirmó mediante la presencia de ureasas (agar urea de Christensen), laccasas (agar Níger) [4] y auxanograma automatizado (VITEK®). Para diferenciar a las dos especies, los aislados se analizaron mediante la resistencia a la canavanina (agar canavanina-glicina-azul de bromotimol, CGB) [5] y asimilación de D-prolina [6].

Los estudios de serotipificación sólo pudieron ser efectuados en algunos cultivos, mediante la prueba de aglutinación de látex (Crypto Check, Iatron Diagnostics, Inc.).

Los aislados obtenidos fueron conservados en refrigeración mediante resiembras subsecuentes en ADS y congelación a -70°C, utilizando leche descremada y glicerol al 25% como agente protector.

Aislamiento de *Cryptococcus* spp a partir de árboles de eucalipto.

Se muestrearon árboles de eucalipto, localizados en ocho zonas de Ciudad Universitaria (UNAM), lugar que alberga diferentes especies de eucaliptos siendo *Eucalyptus camaldulensis* la especie dominante.

Se colectó un total de 923 materiales vegetales (hojas, flores, yemas o cápsulas). Durante 12 meses se llevaron a cabo cuatro muestreos, lo que permitió abarcar las temporadas de lluvias y

secas de nuestra ciudad. Los días en que la colecta fue hecha, se registraron los datos climatológicos.

Cada uno de los materiales vegetales fue cortado en pequeños fragmentos y se trituroó en un mortero, adicionando solución salina con antibióticos, a partir de ese macerado se hizo una dilución 1:100 y se sembraron 10 ml en cajas de Petri conteniendo agar Níger. Los cultivos se incubaron en la oscuridad a 28°C hasta por dos semanas, haciendo revisiones cada dos días.

Las colonias sugestivas de ser *Cryptococcus* spp fueron purificadas en agar Níger para posteriormente hacer las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas correspondientes (crecimiento a 37°C, presencia de pigmentos melánicos, producción de ureasas, desarrollo de cápsula en agar chocolate, sensibilidad a la cicloheximida, presencia de proteasas mediante la hidrólisis de gelatina al 12.0%, producción de almidón, desarrollo de tubo germinativo, presencia de pigmentos en agar extracto de malta, producción de pseudomicelio en agar harina de maíz, fermentación de dextrosa, reducción de nitratos y finalmente, asimilación de carbohidratos y algunos compuestos nitrogenados mediante VITEK®).

Sensibilidad a antifúngicos

Fueron utilizados cinco antifúngicos: Anfotericina B (Cat. A-4888, Sigma-Aldrich), fluconazol (FL01015, Chemical Iberica), itraconazol (BP 907 – F87029 CRS, Council of European Pharmacopeia, Strasbourg), ketoconazol (Cat. K – 1003, Sigma-Aldrich) y caspofungina (Cansidas, Merck). La sensibilidad se efectuó en los aislados clínicos y en algunos cultivos de origen ambiental -aislamiento de materia fecal de palomas- almacenados en la Colección de Hongos del Laboratorio de Micología Médica, UNAM. Se utilizó el método estándar de microdilución, siguiendo las indicaciones del documento M27-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [54].

Las concentraciones finales de los antifúngicos fueron de 16 - 0.03 µg/ml para anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y caspofungina, de 128 - 0.025 µg/ml para fluconazol.

La distribución de los inóculos, diluciones de los fármacos, los controles positivos (cepas de referencia) y negativos (cultivos de *Candida* spp), fue elaborada según los estándares recomendados en el documento M27-A2 [54], con la siguiente modificación: la incubación de las microplacas se efectuó en agitación suave (125 rpm) a 35°C, durante 48 h en atmósfera normal. Esta modificación fue hecha pues se observó que las levaduras del género *Cryptococcus* no tienen buen crecimiento sin agitación, por lo que requieren de ésta para obtener un crecimiento de al menos 0.5 unidades de densidad óptica, en el pozo correspondiente al testigo de crecimiento [54-56]. Los experimentos se elaboraron por duplicado.

Para la lectura de resultados, cada microplaca se pasó por el lector de placas de ELISA a una densidad óptica de 540 nm. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue la menor concentración del antifúngico que inhibió completamente el crecimiento fúngico. Debido a que para *Cryptococcus*

spp, aún no han sido aceptados de manera formal e internacional los puntos de corte en anfotericina B, ketoconazol y caspofungina, se tomaron en cuenta los criterios recomendados por otros autores necesarios para considerar a una cepa resistente: valores de CMI ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ketoconazol e itraconazol; ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para anfotericina B; ≥ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para caspofungina; y ≥ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para fluconazol [54-57].

Genotipificación de aislados clínicos seleccionados.

Esta última etapa estuvo dividida en dos partes 1) Obtención de la "huella digital" del ADN genómico de los aislados, para la caracterización de los genotipos, y 2) Identificación, mediante sondas específicas, de los genotipos VNI y VNII de *C. neoformans* var. *grubii*, principal agente causante de la criptococosis en nuestro medio.

PCR tradicional: PCR-"Huella Digital" (fingerprinting).- La extracción del ADN, fue efectuada en 95 aislados de *Cryptococcus* spp (73 aislados mexicanos, 14 extranjeros y ocho cepas de referencia). Todos los aislamientos fueron cultivados en agar Medio Definido (MgSO_4 10mM, KH_2PO_4 29.4 mM, glicina 13 mM, tiamina $3\mu\text{m}$, glucosa 1mM, agar 18 g, agua 1000 mL), incubándose a 25 °C durante 72 h. Las levaduras fueron lavadas con agua desionizada y el ADN genómico de *C. neoformans* y *C. gattii* fue extraído con el DNeasy Plant Mini Kit® (Qiagen) siguiendo las indicaciones recomendadas por el proveedor. Al final el ADN quedó resuspendido en 50 μl del buffer del proveedor y se almacenó a -20 °C. La calidad y concentración del ADN se observó en un gel de agarosa al 1% en Tris-boratos-EDTA (TBE) 0.5 X, teñido con bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y visualizado bajo luz UV.

Se estandarizaron las condiciones de la PCR para la técnica de microsatélites previamente descrita por Meyer y cols. [10]. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen de reacción de 50 μl conteniendo 25 ng de ADN genómico, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 3.0 mM MgCl_2 , 0.2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 2.5 mM acetato de magnesio, 30 pmol del oligonucleótido core-M13 [5'- GAGGGTGGCGTTCT-3'] (MWG-ElloTech®, U.S.A) y 2.5 U AmpliTaq DNA Polymerase® (Applied Biosystems).

La PCR fue llevada a cabo por 35 ciclos en un termociclador PTC-100® (MJ Research) con 20 s de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a 50°C y 20s de extensión a 72°C, seguida de un ciclo de extensión final de 6 min a 72°C [10]. Todas las amplificaciones fueron elaboradas por triplicado.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5 X a 72 V por 4 h y teñido con bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), visualizándose bajo luz UV en transiluminador y fotografiados utilizando el programa GelDoc-1000® (BioRad).

Las imágenes digitales de los geles mostraron los patrones de PCR fingerprinting obtenidos, los cuales fueron analizados con el software GelCompar I®, versión 4.0 (Applied Maths, Kortrijk,

Belgium). La construcción de la matriz de similitud se basó en la asociación de bandas y se calculó mediante los coeficientes de Jaccard (1.0% de tolerancia). Para la construcción del dendograma fue utilizado el algoritmo UPGMA como método de agrupamiento a partir de la base de datos, programa incluido en el software mencionado.

PCR-Tiempo Real: Sondas FRET (fluorescence resonance energy transfer).- La técnica FRET se caracteriza por su especificidad y sensibilidad. Por ser una técnica novedosa, no utilizada hasta este momento en *Cryptococcus* como modelo, fue escogida por su accesibilidad en ejecución [58-60].

Para el ensayo de PCR, se escogió una región del gen que codifica a lacasa como secuencia blanco, para el ensayo de la PCR. Las sondas FRET fueron diseñadas a partir del alineamiento de secuencias múltiples, reportadas para laccasa a partir del GenBank (Cuadro 7). Se propusieron tres sondas, cada una de ellas ajustada a las dos variedades de *C. neoformans* y una tercera para *C. gattii*; sin embargo, la única sonda experimentada fue la correspondiente a *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, genotipos VNI y VNII.

Los oligonucleótidos para amplificar e identificar la secuencia parcial escogida tuvieron las siguientes secuencias: 5'-TTT CAT GGA CGG TGT CCC TGG TAT-3'(en sentido) y 5'-AAT GAG CTT CCA GGC GGA ATA GGA-3' (en contrasentido) y la sonda FRET para hibridar: 5'-/56-FAM/TCC TTA GGA ACC ACA GGA ATC GGT CA/3BHQ_1/-3'.

Para probar el diseño de las sondas se obtuvo el ADN de cada una de las ocho cepas de referencia (VNI, VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII y VGIV), en las cuales se efectuaron los estudios rutinarios de morfología colonial, pruebas bioquímicas y serología. Posterior al crecimiento de las levaduras en el agar medio definido, durante 28 h a 28°C, el ADN de todos los cultivos fue extraído con el reactivo PrepMan® siguiendo las instrucciones del proveedor.

CUADRO 7. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PARA EL DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONIDAS FRET DISCRIMINATORIAS ENTRE LOS TRES AGENTES CAUSANTES DE CRIPTOCOCOSIS

ACTCAGGTAAGAA	TCC	CTA	GAA	ACC	ACA	GGA	ATT	GGT	CT	TA	ACTGATAAAATTGGTTAGTGTC	<i>Neoformans</i>
ACACAGGTAAGAA	TCC	TTA	GGA	ACC	ACA	GGA	ATC	GGT	CA	AC	TATAAACTGCATAGTGTC	<i>Grubii</i>
ACCCAGGTGAAAA	TCC	TCA	GAA	ACG	ATA	ACA	ATA	GGT	CA	TA	ACTGATCAGTTGATCAGTGTC	<i>Gattii</i>
————	TCC	TTA	GGA	ACC	ACA	GGA	ATC	GGT	CA	————	Probe <i>Grubii</i>	
CGGCATTTGGGG	CCC	GTC	AGT	TCT	CCT	GAC	TTC	TAT	AGC	AA	CTTATCACAGCTG	<i>Neoformans</i>
CGGCATTTGGGG	CCC	GTC	AGT	TTT	CCT	GAC	TTT	TGA	TAA	CA	AGTTATCACAGCTG	<i>Grubii</i>
CGGCCTTTGGGG	ACC	GTC	AGT	TTT	CCT	TAT	TTT	TCA	TAG	CA	AGTCGTCACAGCTG	<i>Gattii</i>
————	CCC	GTC	AGT	TCT	CCT	GAC	TTC	TAT	AGC	A————	Probe <i>Neoformans</i>	
CTCAGGTAAGAA	TCC	CTA	GAA	ACC	ACA	GGA	ATT	GGT	CT	CT	AACTGATAAAT	<i>Neoformans</i>
CACAGGTAAGAA	TCC	TTA	GGA	ACC	ACA	GGA	ATC	GGT	CA	CA	ACTTATAAAC	<i>Grubii</i>
CCAGGTGAAAA	TCC	TCA	GGA	ACG	ATA	ACA	ATA	GGC	CA	CA	TAACTGATCAGT	<i>Gattii</i>
————	TCC	TCA	GGA	ACG	ATA	ACA	ATA	GGC	CA	————	Probe <i>Gattii</i>	

Los ensayos de la PCR se efectuaron mediante el uso de Taq Man MasterMix (Applied Biosystems) el cual consiste de 25 μ l de volumen de reacción, Taq Man MasterMix[®] (dNTP's, buffer, MgCl₂, Taq-polimerasa), oligonucleótidos (20 ng), sonda fluorescente (10 ng) y ADN (200 ng) de cada una de las ocho cepas de referencia a utilizar.

La identificación por la amplificación de la PCR en tiempo real fue llevada a cabo en el equipo ABI7500 y los parámetros de los ciclos: 95°C por 10 mins seguido de 40 ciclos: desnaturalización 90°C por 15 s, alineamiento 50°C por 15 s, extensión 72°C por 1 min, terminando con 72°C por 10 mins.

Los ensayos se repitieron por triplicado y posterior a la amplificación se llevó a cabo el análisis de las curvas "mezcladas" obtenidas. La exploración de la especificidad se basó en: 1) la búsqueda de las secuencias de los oligos y la sondas en BLAST y 2) la no amplificación en aislados de referencia diferentes a *C. neoformans var. grubii*.

RESULTADOS

Identificación y frecuencia de especies.

Se recopiló un total de 211 aislados de *Cryptococcus* spp. La identificación mediante técnicas bioquímicas demostró el predominio de *C. neoformans* (Cuadro 8).

CUADRO 8. FRECUENCIA DE ESPECIES OBTENIDAS A PARTIR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS.

AGENTE ETIOLÓGICO	No. DE AISLAMIENTOS (%)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	183 (86.73)
<i>C. gattii</i>	22 (10.42)
<i>C. albidus</i>	2 (0.94)
<i>C. uniguttulatus</i>	1 (0.50)
<i>Cryptococcus</i> spp.	3 (0.42)
Total	211 (100.0)

El 76% de los aislados presentó cápsulas con diámetros mayores a 4 μm y la forma macroscópica correspondió a colonias de aspecto mucoso, liso, brillante, de crecimiento ilimitado deslizándose por el medio (morfología clásica), el resto correspondió a colonias de tipo seco. Los dos tipos de colonias, las mucosidades y las secas, fueron identificadas tanto en *C. neoformans* como en *C. gattii*. De los 18 aislados serotipificados, nueve correspondieron al serotipo A, siete al serotipo B, uno al C y uno al D, este último referido mediante las pruebas bioquímicas como *C. gattii*.

El 92.5% de las cepas se aisló a partir de líquido cefalorraquídeo; las restantes provinieron de médula ósea, sangre, ganglio, esputo, lavado broncoalveolar y biopsia de hígado. Se encontró que la micosis predomina en el sexo masculino (87.3%) y en personas entre la tercera (33.8%) y cuarta (37.5%) décadas de la vida. El SIDA se describió como el principal factor de oportunismo.

Aislamiento a partir de *Eucalyptus* spp.

Los hongos aislados fueron tipificados morfológica y bioquímicamente. Se identificó un total de 4,179 colonias (Cuadro 9), dentro de las cuales sólo siete correspondieron a *Cryptococcus albidus*. A diferencia de otros autores, no se obtuvo aislamiento de *C. neoformans* y *C. gattii* (Fig. 4).

CUADRO 9. FRECUENCIA DE GÉNEROS FÚNGICOS EN 4,179 COLONIAS OBTENIDAS DE *Eucalyptus* spp

Géneros	Número de Colonias (%)	Géneros	Número de Colonias (%)
<i>Scopulariopsis</i>	1 (0.1)	<i>Sporobolomyces</i>	191 (4.6)
<i>Cryptococcus</i>	7 (0.1)	<i>Aspergillus</i>	191 (4.6)
<i>Fusarium</i>	10 (0.2)	<i>Alternaria</i>	232 (5.6)
<i>Monilia</i>	15 (0.4)	<i>Penicillium</i>	318 (7.7)
Micelia sterilia	34 (0.8)	<i>Trichosporon</i>	358 (8.6)
<i>Cladosporium</i>	76 (1.8)	<i>Exophiala</i>	394 (9.4)
<i>Zygosporum</i>	79 (1.9)	<i>Epicoccum</i>	407 (9.7)
<i>Tricladium</i>	110 (2.7)	<i>Aureobasidium</i>	407 (9.7)
Mucorales	120 (2.9)	<i>Candida</i>	551 (13.1)
<i>Rhodotorula</i>	121 (2.9)	<i>Saccharomyces</i>	557 (13.3)

Sensibilidad a los antifúngicos.

La respuesta de sensibilidad y resistencia fue similar en todos los aislados de *Cryptococcus*: fueron susceptibles al ketoconazol, itraconazol, fluconazol y anfotericina B (valores de CMI entre 0.03-0.5 µg/ml); mientras que para la caspofungina todos fueron resistentes (CMI de 6-32 µg/ml).

Huella digital por PCR.

Los patrones de la amplificación aleatoria con el iniciador 'core' M13 de 73 aislados mexicanos (65 *C. neoformans* y ocho *C. gattii*) y 14 extranjeros, fueron comparados con aquellos obtenidos con las cepas de referencia. La correlación de los genotipos fue asignada por la posición de las bandas principales mostradas en las cepas de referencia utilizadas (Fig. 5) por lo que la presencia de esas mismas bandas (mismo patrón) en el ADN de los aislados experimentales determinó la asignación del genotipo.

Los ocho patrones genotípicos, formalmente designados en la literatura de VNI a VNIV y de VGI a VGIV fueron identificados en los 73 aislados mexicanos (Figs. 6 y 7).

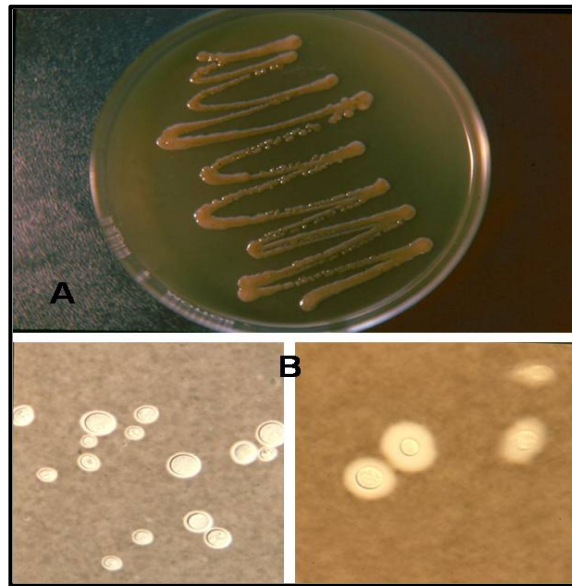


FIGURA 4. *Cryptococcus albidus* AISLADO DE *Eucalyptus* spp EN AGAR NIGER. A) COLONIAS DE COLOR ROSADO CLARO, BRILLANTES Y MUCOIDES. B) LEVADURAS REDONDAS O ALARGADAS CON CÁPSULAS CHICA Y GRANDE.

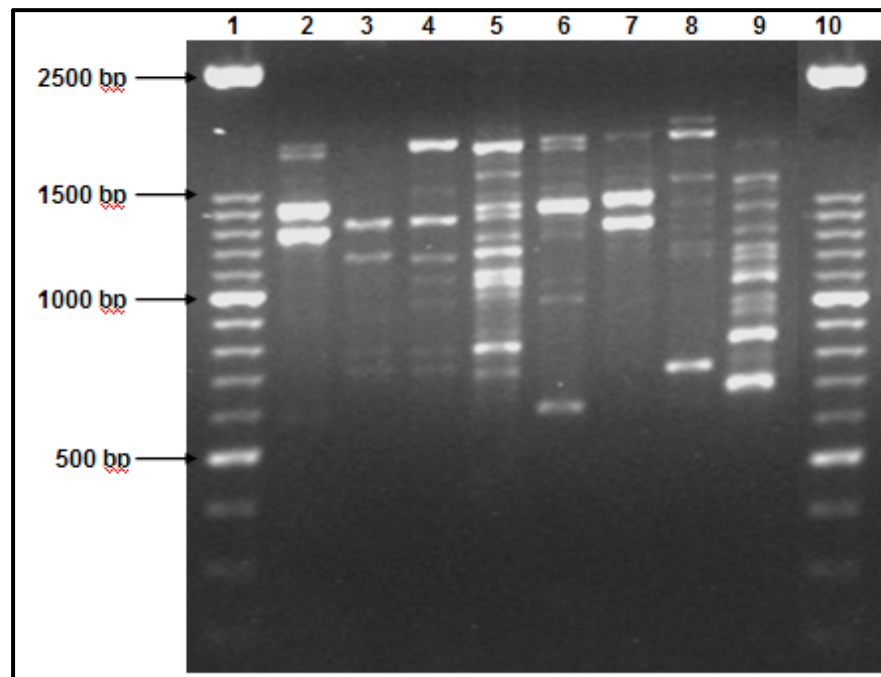


FIGURA 5. GENOTIPOS DE LAS OCHO CEPAS DE REFERENCIA. LÍNEAS 1 Y 10: MARCADOR DE PESO MOLECULAR IV (100 KB), LÍNEA 2: VNI (WM 148 SEROTIPO A), LÍNEA 3: VGIII (WM 175 SEROTIPO B), LÍNEA 4: VGII (WM 178 SEROTIPO B), LÍNEA 5: VGI (WM 179 SEROTIPO B), LÍNEA 6: VNII (WM 626 SEROTIPO A), LÍNEA 7: VNIII (WM 628 SEROTIPO AD), LÍNEA 8: VNIV (WM 629 SEROTIPO D), LÍNEA 9: VGIV (WM 779 SEROTIPO C)

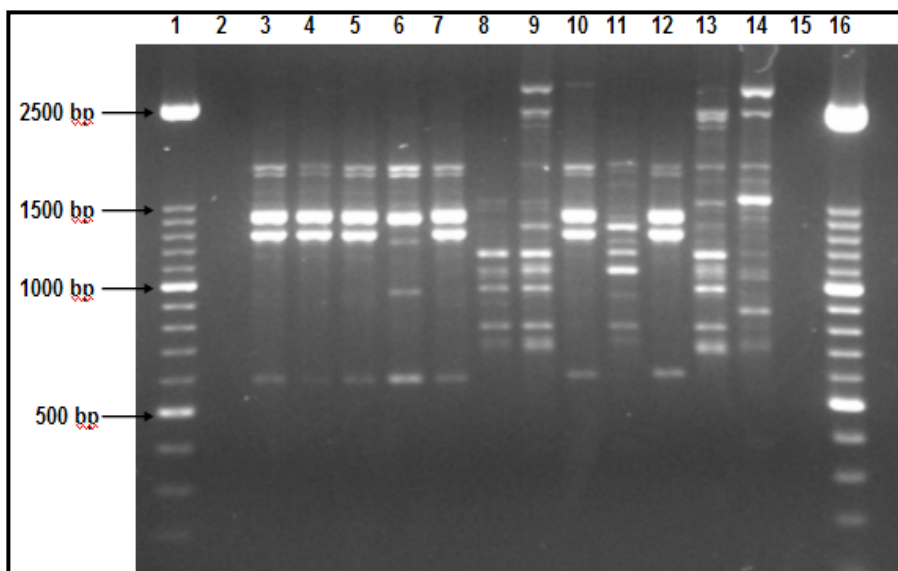


FIGURA 6. PATRONES DE LOS GENOTIPOS EN AISLADOS MEXICANOS DE *Cryptococcus* spp. LÍNEAS 1 Y 16: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 PB), LÍNEAS 2 Y 15: CONTROL NEGATIVO, LÍNEA 3: VNI, LÍNEA 4: VNI, LÍNEA 5: VNI, LÍNEA 6: VNII, LÍNEA 7: VNI, LÍNEA 8: VGII, LÍNEA 9: VGII, LÍNEA 10: VNI, LÍNEA 11: VGIII, LÍNEA 12: VNI, LÍNEA 13: VGII Y LÍNEA 14: VGIV.

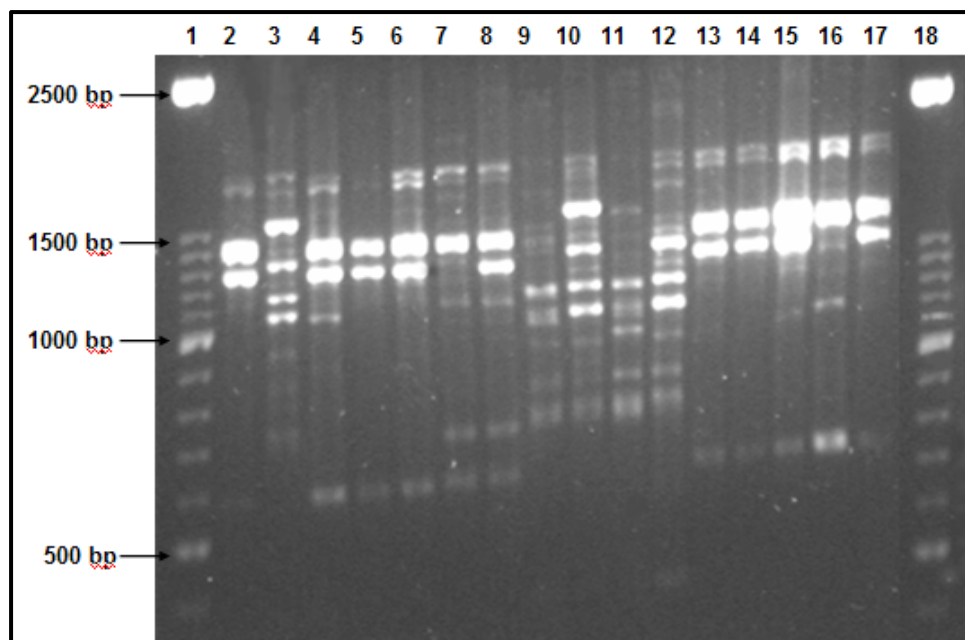


FIGURA 7. PATRONES DE LOS GENOTIPOS EN AISLADOS MEXICANOS DE *Cryptococcus* spp. LÍNEAS 1 Y 18: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 PB), LÍNEA 2: VNIII, LÍNEA 3: VGI, LÍNEA 4: VNI, LÍNEA 5: VNI, LÍNEA 6: VNI, LÍNEA 7: VNII, LÍNEA 8: VNI, LÍNEA 9: VGII, LÍNEA 10: VGI, LÍNEA 11: VGII, LÍNEA 12: VGIII, LÍNEA 13: VNI, LÍNEA 14: VNI, LÍNEA 15: VNI, LÍNEA 16: VNII Y LÍNEA 17: VNI

El cuadro 10, muestra la distribución de los grupos genotípicos encontrados en las cepas mexicanas y extranjeras analizadas.

CUADRO 10. FRECUENCIA DE LOS GRUPOS GENOTÍPICOS IDENTIFICADOS EN LOS AISLADOS ESTUDIADOS.

	VNI	VNII	VNIII	VNIV	VGI	VGII	VGIII	VGIV	TOTAL
México	56	5	3	1	2	2	2	2	73
España	4	1							5
Colombia	2					1	1		4
EUA				1					1
Australia						2		2	4
TOTAL	62	6	3	2	2	5	3	4	87

Entre los ocho pacientes infectados con *C. gattii*, coincidentemente los aislados se distribuyeron de manera equitativa entre los cuatro genotipos: dos VGI, dos VGII, dos VGIII y dos VGIV. Seis de estos pacientes fueron considerados inmunocompetentes, dos refirieron enfermedades de base (uno, VGII, con insuficiencia hepática y otro, VGIV, con adenoma de la hipófisis), consecuentemente no se muestra asociación específica entre el genotipo y la condición clínica del paciente. Ninguno de esos pacientes se asoció a SIDA (cuadro 11).

A excepción de un caso, las técnicas de CGB y asimilación de la D-prolina, utilizadas para la diferenciación entre especies, correlacionaron con los genotipos generales: VN ó VG, y de los 18 aislados serotipificados el genotipo correlacionó positivamente con el serotipo referido para cada uno de ellos.

Los siete aislados identificados como serotipo B se distribuyeron entre los cuatro genotipos VG y el aislado serotipo C correspondió a VGIV (cuadro 11).

De los aislados mexicanos, la técnica permitió distinguir entre los serotipos A, D y AD de *C. neoformans*; sin embargo, y aún cuando ha sido referido que el genotipo VGIV corresponde al serotipo C [11], en nuestro caso en ese genotipo también estuvo integrado una cepa serotipo B, es decir, la técnica no permitió discriminar entre los serotipos B y C de *C. gattii* (cuadro 11).

Para los 14 aislados extranjeros incluidos en el análisis se encontró la siguiente distribución: VNI y VNII para los españoles, VNI, VGII y VGIII para los pertenecientes a Colombia, VGII y VGIV para los australianos y VNIV para el de EUA (cuadro 11).

La distribución de los grupos de genotipos en el dendograma muestra que no hay discriminación por área geográfica (Fig. 8)

Al comparar los resultados de este trabajo con lo reportado por Meyer y cols. [10], observamos que las distribuciones para los genotipos VN tienen la misma jerarquía; sin embargo, las diferencias son evidentes en el grupo VG y se encuentran sobretodo en las frecuencias estimadas para el genotipo VGIII. Las diferencias observadas podrían explicarse tomando en cuenta el hospital o tipo de servicio a partir de donde fueron obtenidos cada uno de los aislados. En nuestro caso conocemos cual es el hospital de procedencia, pero desconocemos el servicio al que pertenecían. Otro hallazgo contrastante en nuestro estudio es la notificación de un mayor número de genotipos que lo reportado previamente (cuadro 12).

Identificación mediante sondas FRET.

Las dos cepas de referencia *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A, genotipos VNI y VNII) fueron correctamente identificadas con la sonda FRET diseñada; sin embargo, la identificación de las seis cepas de referencia restantes falló en un 50%. En total, en cinco de las ocho cepas de referencia analizadas, los resultados fueron los esperados (Cuadro 13).

Las sondas FRET aplicadas no mostraron una buena correlación con la técnica de PCR tradicional (PCR-“huella digital”), por lo que será necesario corregir el diseño del ensayo.

CUADRO 11. RESUMEN DE LA ASOCIACIÓN DE LOS GENOTIPOS IDENTIFICADOS CON LAS VARIABLES ANALIZADAS.

Genotipo (No. de aislados analizados)	Sexo	Edad	Residencia	Especimen	Enf. Base	Morfología	Pruebas bioquímicas	Serotipo
VNI (56)	Indistinto. Masculino y femenino.	Indistinta. Desde la 2 ^a . hasta la 8 ^a . década de la vida, teniendo las mayores frecuencias entre la 3 ^a . y 4 ^a . década.	Indistinta. Asociados diferentes estados de la república mexicana, todos ellos con distintas condiciones climáticas. La mayor frecuencia fue encontrada entre el Distrito Federal y el estado de México.	Indistinto. LCR, sangre y médula ósea.	Alta afinidad con pacientes con SIDA, solo en dos cepas la enfermedad de base fue otra y en ningún caso hubo asociación a pacientes inmunocompetentes.	Indistinta. Clásica y atípica, predominando la clásica.	Identificación como grupo <i>grubii</i> / <i>neoformans</i>	Correlación positiva con los siete aislados identificados como serotipo A.
VNII (5)	Todos sexo masculino	Distribución en la 3 ^a . y 5 ^a . década de la vida	Áreas de clima no tropical, predominando DF.	Todas de LCR.	Predominantemente asociado a pacientes con SIDA. No asociación con pacientes inmunocompetentes	Indistinta	Identificación como grupo <i>grubii</i> / <i>neoformans</i>	Correlación positiva con los dos aislados identificados como serotipo A.
VNIII (3)	Indistinto	Distribución en la 3 ^a . y 4 ^a . década de la vida.	Áreas de clima no tropical.	Indistinto entre LCR y sangre	SIDA	Clásica	Identificación como grupo <i>grubii</i> / <i>neoformans</i>	Ningún aislado pudo ser confirmado serológicamente

Genotipo (No. de aislados analizados)	Sexo	Edad	Residencia	Espécimen	Enf. Base	Morfología	Pruebas bioquímicas	Serotipo
VNIV (1)	Masculino	Ubicado en 4 ^a . década de vida.	Dato desconocido.	LCR	SIDA	Clásica.	Identificación como <i>C. gattii</i>	Serotipo D.
VGI (2)	Indistinto	Presente en la 2 ^a . Y 5 ^a . década de vida.	Áreas de clima tropical	LCR	Ninguno	Indistinta	Identificación como <i>C. gattii</i>	Correlación positiva con la identificación como serotipo B.
VGII (2)	Indistinto	Presente en la 2 ^a . década de vida.	Indistinto, áreas de clima templado y tropical.	LCR.	Ninguno.	Clásica	Identificación como <i>C. gattii</i>	Correlación positiva con la identificación como serotipo B.
VGIII (2)	Femenino	Presente en la 1 ^a . y 4 ^a décadas de vida.	Áreas de clima no tropical.	LCR.	Inmunocompetentes	Atípica	Identificación como <i>C. gattii</i>	Correlación positiva con la identificación como serotipo B.
VGIV (2)	Masculino	Presente en la 4 ^a . y 5 ^a décadas de vida.	Zonas de climas no tropicales	LCR.	Adenoma en la hipófisis y otro con insuficiencia hepática.	Atípica	Identificación como <i>C. gattii</i>	Serológicamente los aislados correspondieron a los serotipos B y C. Buena correlación con el genotipo.

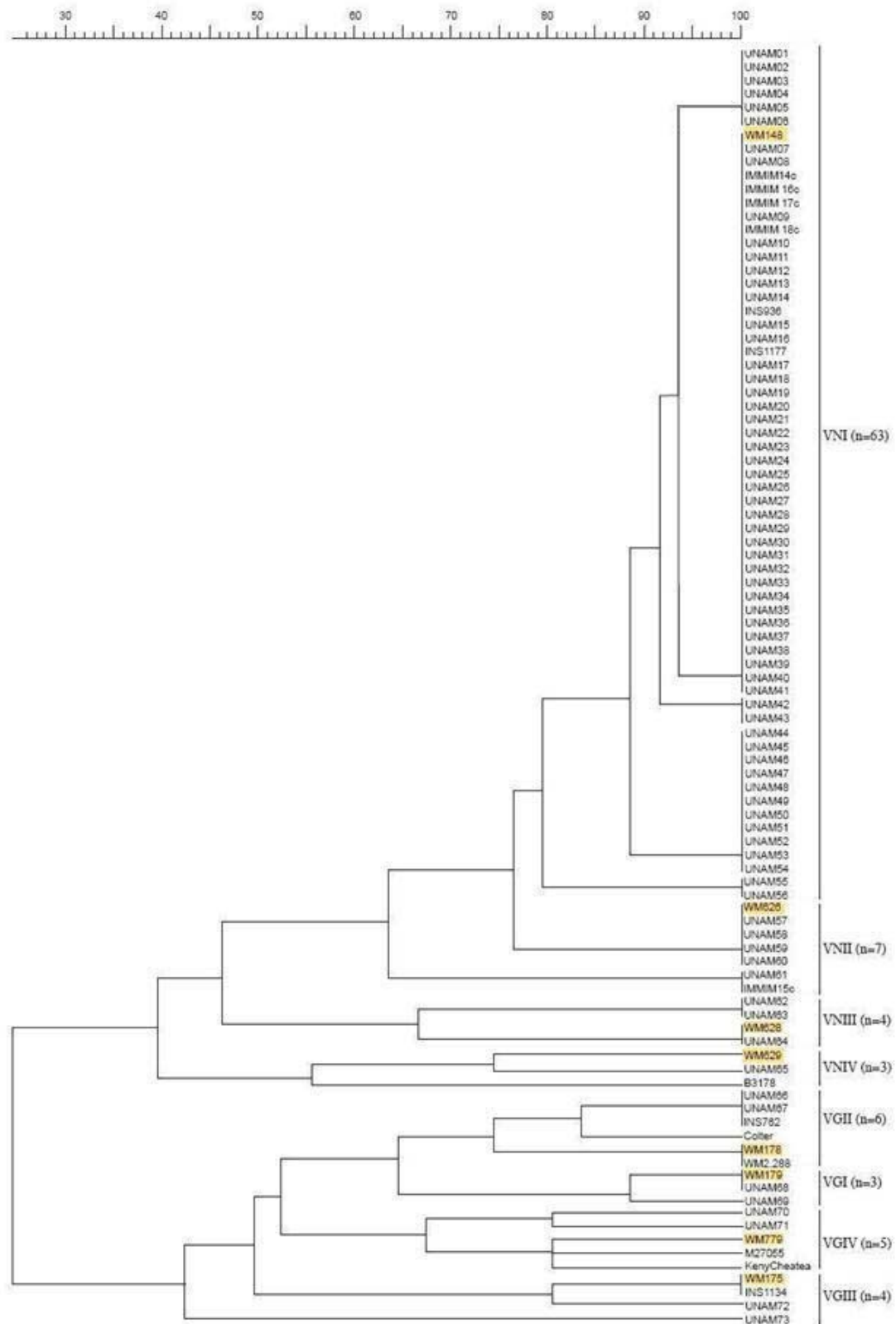


FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS CORRESPONDIENTES A LOS AISLADOS ANALIZADOS (73 MEXICANOS, CINCO ESPAÑOLES, CUATRO COLOMBIANOS, CUATRO AUSTRALIANOS Y UNO DE EUA). MARCADAS EN AMARILLO, POSICIÓN DE LAS OCHO CEPAS DE REFERENCIA

CUADRO 12. COMPARACION DE LOS GENOTIPOS DE CEPAS DE *Cryptococcus* spp MEXICANAS, EN DOS ESTUDIOS DIFERENTES.

GENOTIPO	Meyer y cols., 2003	Este trabajo
VNI	25	56
VNII	1	5
VNIII	1	3
VNIV	0	1
VGI	3	2
VGII	0	2
VGIII	13	2
VGIV	3	2
Total de cepas estudiadas	46	73

CUADRO 13. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE *Cryptococcus* spp., MEDIANTE LA Sonda FRET DISEÑADA PARA *C. neoformans* var. *grubii*.

CEPA	AGAR NIGER Y UREA	AGAR CGB Y D-PROLINA	SEROTIPO	GENOTIPO	AMPLIFICACIÓN POR Sonda FRET	RESULTADO
WM148	+	<i>grubii/neoformans</i>	A	VNI	positiva	correcto
WM175	+	<i>gattii</i>	B	VGIII	negativa	correcto
WM178	+	<i>gattii</i>	B	VGII	negativa	correcto
WM179	+	<i>gattii</i>	B	VGI	positiva	incorrecto
WM626	+	<i>grubii/neoformans</i>	A	VNII	positiva	correcto
WM628	+	<i>grubii/neoformans</i>	D	VNIII	positiva	incorrecto
WM629	+	<i>grubii/neoformans</i>	AD	VNIV	positiva	correcto
WM779	+	<i>gattii</i>	C	VGIV	positiva	incorrecto

DISCUSIÓN

El estudio de frecuencia de *Cryptococcus* spp en aislados clínicos reportó la presencia de *C. albidus* y *C. uniguttulatus*. La incidencia de estos hongos revela el evidente deterioro del sistema inmune del paciente, ya que esas especies son consideradas inocuas para el hombre y otros animales. Por supuesto con las técnicas a nuestro alcance, aún resta por confirmar por métodos genotípicos la identidad de esos aislados

Con los resultados obtenidos hemos observado que en México, al igual que en otros países, la meningoencefalitis es la forma clínica más común con la que se presenta la criptococosis; sin embargo, los datos registrados de la enfermedad y de los agentes etiológicos en los hospitales o centros de salud en México son muy escasos, característica que es compartida con la mayor parte de países latinoamericanos [61].

En el estudio de aislamiento a partir de árboles de eucalipto fue evidente el dominio de las levaduras (*Candida* 13.1 % y *Trichosporon* 8.6 %) sobre los hongos filamentosos (*Penicillium* 7.7 %, *Alternaria* 5.6 %, *Aspergillus* 4.6 %); sin embargo *C. albidus*, a diferencia de otros estudios, fue hallado en una frecuencia muy baja lo que sugiere que el crecimiento de esta especie de levadura se ve inhibido por el desarrollo de otros hongos que compiten por el mismo substrato [46]. En ninguno de los árboles analizados se aisló *C. neoformans* o *C. gattii*, posiblemente porque el campus Ciudad Universitaria, a pesar de contar con reservas ecológicas, es una zona altamente perturbada debido a las modificaciones urbanas del lugar. Habrá que continuar con la búsqueda de la fuente ambiental natural de *C. gattii* debido a que el reporte de casos de criptococosis causados por esta especie aún continúa en nuestra ciudad.

Varios de los géneros fúngicos identificados en los materiales vegetales de eucalipto son considerados como causantes de alergia en el humano, especialmente *Cryptococcus albidus* que ha sido reportado como causante de la neumonitis alérgica del verano. Debido al tipo de microbiota aislada, se ha visto que el papel de los eucaliptos es, que actúan más como una fuente importante de alérgenos, que como reservorios de *C. gattii* o *C. neoformans* [62].

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad de 87 aislados (73 mexicanos y 14 extranjeros) a los cinco antifúngicos probados son consistentes con lo referido previamente: no mostraron discrepancia comparados con estudios similares llevados a cabo aun con otro tipo de aislados [12-13, 57]. La importancia de este análisis radica en que es pionero en México adaptándose las condiciones del método para *Cryptococcus* spp. Las modificaciones propuestas podrían ser consideradas para estandarizar las CMI en las levaduras no fermentadoras del género *Cryptococcus*, contribuyendo así a la elaboración de una versión más avanzada del documento M27-A2 [54].

La técnica desarrollada de huella digital-PCR mostró que en México la distribución de los genotipos sólo se encuentra relacionada con las especies, variedades de especie de la levadura, serotipo de la levadura y presencia o ausencia de SIDA en el paciente. Datos como sexo, edad y origen del paciente, sitio corporal de donde fue aislada la levadura, así como las formas y susceptibilidad antifúngica son parámetros que no mostraron asociación con la frecuencia y la distribución de los genotipos.

En el presente estudio se muestra que la mayor parte de los casos de criptococosis en nuestro país se da en pacientes con SIDA, los cuales están más predispuestos a la infección por cepas con genotipos VNI y VNII (*C. neoformans* var. *grubii*). Estos resultados que coinciden con los registrados en otros lugares del mundo [63].

Hubo reciprocidad entre los resultados de las pruebas bioquímicas, el análisis serológico y los patrones genotípicos. Estos datos nos indican que, de manera general, el nivel de confiabilidad es alto en las pruebas rutinarias para identificar a los aislados de *Cryptococcus*, por lo que en el caso de no tener al alcance la infraestructura que permita el análisis a nivel molecular sería necesario promover en los laboratorios el uso de las técnicas de biotipificación tradicionales.

El hallazgo de una cepa genotipo VNIV con serotipo D pero bioquímicamente identificada como *C. gattii*, demuestra que en México tenemos aislados de *C. neoformans* resistentes a la canavanina y capaces de asimilar D-prolina, tal y como ha sido documentado en otros lugares [35-37]. Este dato confiere una categoría epidemiológica especial debido a la existencia altamente probable de un representante híbrido inter-especie. Será necesario implementar otras técnicas de tipificación molecular y quizá el uso de la citometría de flujo para corroborar esta hipótesis.

Debido a que no en todas las cepas mexicanas y extranjeras pudo obtenerse el dato preciso de origen geográfico del paciente o sus actividades migratorias, no podemos conocer si los genotipos encontrados vienen de regiones cercanas con condiciones ambientales similares, y de esta manera explicar la presencia de genotipos en México que no habían sido descritos anteriormente. El Distrito Federal y el Estado de México son regiones que, según la clasificación de Strahler, son consideradas zonas de clima templado, semifrío, semiseco y cálido (coincide con la clasificación de Köpper con BWh y Bhs), ambas zonas con 13°C como promedio anual de temperatura [64]. El hallazgo de *C. gattii* en este tipo de áreas confirma que su distribución no está limitada sólo a climas tropicales como tradicionalmente se había considerado. De manera general encontramos que en México la distribución de los genotipos VN y VG obtenidas no depende directamente del lugar geográfico.

Todos los genotipos formalmente descritos en la literatura fueron encontrados en los aislados mexicanos analizados. Epidemiológicamente el hecho es relevante pues ahora conocemos que la distribución mundial de los genotipos tiene una extensión territorial mucho más amplia de lo que se había pensado. El genotipo VNIV (serotipo D) prácticamente se había considerado como

“endémico” de países europeos, pero los análisis moleculares han demostrado la presencia de este genotipo en Australia, Nueva Zelanda, Colombia y Chile, por lo que ahora no resulta extraordinario encontrarlo en nuestro país.

Otro hallazgo interesante es la observación del genotipo VGII, reportado previamente en Malasia, Canadá, Brasil y Colombia. Brasil, Colombia y ahora México, son los únicos lugares en Latinoamérica en donde la criptococosis está representada con trabajos de epidemiología molecular, que han permitido conocer la amplia variabilidad genética que tienen las respectivas cepas de *Cryptococcus*. Evolutivamente este resultado cobra importancia ya que *C. gattii* genotipo VGII es una levadura con una distribución mundial limitada, por lo que será interesante conocer los posteriores análisis filogenéticos que esclarezcan el parentesco que existe entre las cepas mexicanas y las de otros países.

La posición geográfica de México favorece la presencia de gran diversidad ecológica que a su vez permite el establecimiento de múltiples tipos de hábitats (desierto, bosque, selva, etc.). Con tales características ambientales, no es raro que todos los genotipos que han sido descritos para diferentes zonas en el mundo se identifiquen en nuestro país. Queda por investigar la frecuencia de genotipos en aislados provenientes del ambiente y correlacionarla con la información que se obtenga a partir de especímenes patológicos.

El genotipo obtenido de los aislados extranjeros analizados nos permitió observar que la variación genética respecto a lo hallado en México tiene una distribución global homogénea, lo cual evidencia la clonalidad que existe entre los aislados pertenecientes a *C. neoformans* var. *grubii*, a diferencia de lo mostrado por los genotipos de *C. gattii*.

La técnica FRET fue escogida por su accesibilidad en ejecución pero, desafortunadamente en nuestro caso, con la información génica que teníamos a la mano, el método no alcanzó la especificidad deseada. En nuestro análisis los resultados comparativos entre pruebas bioquímicas, serotipos y genotipos *vs.* sondas FRET sólo mostraron una correlación positiva en el 56% del muestreo. Es necesario corregir el diseño del ensayo mediante alguna de las siguientes propuestas: 1) Revisar y re-evaluar las secuencias escogidas para la elaboración de las sondas; 2) Revisar la proporción y el tipo de fluoróforo usado y 3) Estandarizar nuevamente los gradientes de temperatura y las mezclas de reactivos para la amplificación. Con los resultados obtenidos consideramos que el desarrollo de la técnica, con las modificaciones pertinentes del diseño de las sondas, tiene altas probabilidades de resultar innovadora y útil en la identificación rápida y sencilla de las especies de *Cryptococcus*.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido concluir que:

- La investigación efectuada arrojó que año con año se siguen diagnosticando casos de criptococosis en México, por lo que se ha demostrado que es una infección prevalente en nuestro país y no es esporádica como tradicionalmente se ha considerado.
- Se comprobó que en México, los árboles del género *Eucalyptus* spp, no fungen como huéspedes o reservorios naturales de la levadura *Cryptococcus gattii*.
- Los antimicóticos empleados demostraron que la tasa de resistencia de *Cryptococcus* spp ante ellos es baja, por lo que afortunadamente el diseño de un programa de resistencia antifúngica para el tratamiento de la criptococosis, aún no es necesario en nuestro medio.
- En México se presentan los ocho genotipos reportados para el complejo *C. neoformans* / *C. gattii* (VNI, VNII, VNIII, VNIV, VGI, VGII, VGIII y VGIV) lo que nos coloca como un país epidemiológicamente importante en cuanto a la frecuencia y distribución de los agentes etiológicos de esta grave infección, en personas con sistemas inmunológicos debilitados.
- Al igual que en el resto del mundo, en México *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (genotipos VNI y VNII) es el principal agente etiológico de la criptococosis.
- Desafortunadamente la complejidad del genoma del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*, no pudo ser discriminada mediante las sondas FRET propuestas, por lo que será necesario evaluar otros métodos específicos de identificación molecular.

PERSPECTIVAS A FUTURO

- Se ha dado a conocer un panorama general de la frecuencia y la distribución de la criptococosis en México, así como la de los fenotipos y genotipos de *C. neoformans* y *C. gattii*, datos que sirven de plataforma para continuar con la búsqueda y descripción de los hábitats de las especies de *Cryptococcus* y por consiguiente las fuentes de infección potenciales de esta levadura.
- Se generaron ocho patrones de 'huella digital' por PCR bajo condiciones estandarizadas en cepas mexicanas de *C. neoformans* y *C. gattii*. Debido a que cada patrón corresponde a un genotipo, podrán ser usados como referencia y controles internos en estudios futuros de aislados criptococales, en técnicas de tipo molecular.
- Debido a que la morbilidad y mortalidad por criptococosis permanecen altas, un desafío crítico es trasladar nuestro avance en el conocimiento biológico de este organismo (progresos en genómica, proteómica y metabolómica) para obtener mejoramientos reales de terapia antifúngica y quizá vacunas preventivas, objetivos principales del grupo consenso MLST en el cual México puede comenzar su participación gracias al desarrollo de los estudios de genotipificación alcanzados al momento.

REFERENCIAS

1. Casadevall A, Perfect J. *Cryptococcus neoformans*. Edit. American Society Microbiology 1998, 541 pp, Washington D.C., U.S.A. ISBN: 1555811078.
2. Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol* 2009;67:131-190.
3. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 2006;20:507-544.
4. Staib F, Seibold M, Antweiler E, Frohlich B. Staib agar supplemented with a triple antibiotic combination for the detection of *Cryptococcus neoformans* in clinical specimens. *Mycoses* 1989;32:448-454.
5. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic médium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982;15:535-537.
6. Dufait R, Velho R, De Vroey C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen* 1987;30:483.
7. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (*Basidiomycota*, *Hymenomyces*, *Tremellomycetidae*). *Taxon* 2002;51:804–806.
8. Lea Doering T. How Sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology* 2009;63:223-247.
9. Cardinali G, Martini A, Preziosi R, Bistoni F, Baldelli F. Multicenter comparison of three different analytical systems for evaluation of DNA banding patterns from *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2002;40:2095-2100.
10. 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;9:189-195.
11. Tay ST, Lim HC, Tajjudin TH, Rohani MY, Hamimah H, Thong KL. Determination of molecular types and genetic heterogeneity of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in Malaysia. *Med Mycol* 2006;44:617-622.
12. Souza LKH, Souza Junior AH, Costa CR, Faganello J, Vainstein_MH, Chagas ALB, Souza ACM, Silva MRR. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. *Mycoses* 2010;53:62-67.
13. Guinea J, Hagen F, Peláez T, Boekhout T, Tahoune H, Torres-Narbona M, Bouza E. Antifungal susceptibility, serotyping, and genotyping of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected during 18 years in a single institution in Madrid, Spain. *Med Mycol*. 2010 En prensa.

14. Xu J, Vigalys R, Mitchell TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Ecol* 2000;9:1471-1481.
15. Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 2006;6:574-587.
16. Litvintseva AP, Lin X, Templeton I, Heitman J, Mitchell TG. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa. *PLoS Pathog* 2007;17;3:e114.
17. Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol* 2008;25:S4-S12.
18. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Fisher M, Gilgado F, Hagen F, Kaocharoen S, Litvintseva AP, Mitchell TG, Simwami SP, Trilles L, Viviani MA, Kwon-Chung J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 2009;47:561-570.
19. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 2006;60:69-105.
20. Kwang-Woo J, Yong-Sun B. The Stress-Activated Signaling (SAS) pathways of a human fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Mycobiol* 2009;37:161-170.
21. Ellis D, Pfeiffer T. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol* 1992;8:321-325.
22. Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 2001;39:155-168.
23. Castanón-Olivares LR, López-Martínez R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses* 1994;37:325-327.
24. López-Martínez R, Castañón-Olivares LR. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. *Mycopathologia* 1995;129:25-28.
25. Garza-Garza D, Buendia-Urbe JL, Martínez-Cruz E, Argüero-Licea B. Characterization of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Rev Latinoam Microbiol* 1995;37:273-279.
26. Quintero E, Castaneda E, Ruiz A. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* in the department of Cundinamarca-Colombia. *Rev Iberoam Micol* 2005;22:93-98.
27. Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 2003;5:667-675.
28. Kozubowski L, Chan Lee S, Heitman J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cellular Microbiology* 2009;11:370-380.

29. Vanbreuseghem R, Takashio M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. Part II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. Ann Soc Belge Med Trop 1970;50:695-702.
30. Castanón-Olivares LR, López-Martínez R, Barriga-Angulo G, Ríos-Rosas C. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient: first observation in Mexico. J Med Vet Mycol 1997;35:57-59.
31. Springer DJ, Chaturvedi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. Emerg Infect Dis 2010;16:14-20.
32. Argüero Licea B, Garza Garza D, Flores Urbieto V, Cervantes Olivares RA. Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. Rev Iberoam Micol 1999;16:40-42.
33. Chaturvedi S, Dyavaiah M, Larsen RA, Chaturvedi V. *Cryptococcus gattii* in AIDS patients, Southern California. Emerg Infect Dis 2005;11:1686.
34. MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, Kronstad JW, Morshed MG, Bartlett KH. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific northwest, USA. Emerg Infect Dis 2007;13:42-50.
35. 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;52:271-275.
36. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, Hoogveld HL, Boekhout T. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. FEMS Yeast Res 2006;6:599-607.
37. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G, Boekhout T. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. Emerg Infect Dis 2008;14:1105-1108.
38. Moranova Z, Kawamoto S, Raclavsky V. Hypoxia sensing in *Cryptococcus neoformans*: biofilm-like adaptation for dormancy? Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2009;153:189-193.
39. Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerg Infect Dis 2008;14:755-762.
40. Baddley JW, Perfect JR, Oster RA, Larsen RA, Pankey GA, Henderson H, Haas DW, Kauffman CA, Patel R, Zaas AK, Pappas PG. Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:937-943.

41. 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.
42. Cabello S, Rivera C. Criptococosis intestinal primaria en un paciente inmunocompetente. *Med Int Mex* 2002;18:258-262.
43. Padilla MC, Alonzo L, Novalés J, Ramos-Garibay A, González García G, Eng A. Criptococosis cutánea diseminada. Presentación de un caso. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2004;13:16-20.
44. Méndez-Sánchez N, Pichardo-Bahena R, Villegas Castrejón H, Berron-Pérez RD, Hernández-Bautista VM, Soto-Ramírez L, Alessio LP. Necrotizing hepatitis and intrahepatic cholestasis associated to *Cryptococcus* sp. and *Pneumocystis carinii*. *Ann Hepat* 2006;5:289-290.
45. Antinori S. Cryptococcosis: we should do better! *Clin Infect Dis* 2006;43:948-950.
46. Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi-the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:332-337.
47. Yauch LE, Lam JS, Levitz SM. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus* capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathog* 2006;2:e120.
48. Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 2003;5:1-10.
49. Chen SH, Stins MF, Huang SH, Chen YH, Kwon-Chung KJ, Chang Y, Kim KS, Suzuki K, Jong AY. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* 2003;52:961-670.
50. Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA, Allen JE, Bosdet IE, Brent MR, Chiu R, Doering TL, Donlin MJ, D'Souza CA, Fox DS, Grinberg V, Fu J, Fukushima M, Haas BJ, Huang JC, Janbon G, Jones SJ, Koo HL, Krzywinski MI, Kwon-Chung JK, Lengeler KB, Maiti R, Marra MA, Marra RE, Mathewson CA, Mitchell TG, Perteza M, Riggs FR, Salzberg SL, Schein JE, Shvartsbeyn A, Shin H, Shumway M, Specht CA, Suh BB, Tenney A, Utterback TR, Wickes BL, Wortman JR, Wye NH, Kronstad JW, Lodge JK, Heitman J, Davis RW, Fraser CM, Hyman RW. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 2005;307:1321-1324.
51. Schein JE, Tangen KL, Chiu R, Shin H, Lengeler KB, MacDonald WK, Bosdet I, Heitman J, Jones SJ, Marra MA, Kronstad JW. Physical maps for genome analysis of serotype A and D strains of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res* 2002;12: 1445-1453.
52. Hu G, Liu I, Sham A, Stajich JE, Dietrich FS, Kronstad JW. Comparative hybridization reveals extensive genome variation in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Biol* 2008;9:R41.

53. Góngora-Rivera F, Santos-Zambrano J, Moreno-Andrade T, Calzada-López P, Soto-Hernández JL. The clinical spectrum of neurological manifestations in AIDS patients in Mexico. *Arch Med Res* 2000;31:393-398.
54. Pfaller MA, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rex JH, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Walsh TJ, Warnock DW. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard (M27-A2) —Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002 Volume 22 Number 15 ISBN 1-56238-469-4 ISSN 0273-3099, 30 pp.
55. Martínez C. Identificación de cepas de *Cryptococcus neoformans* y determinación de su susceptibilidad a la caspofungina y anfotericina B. Licenciatura de Químico Biólogo Parasitólogo. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Enero, 2004
56. Téllez CV. Estudio de la susceptibilidad in vitro al ketoconazol, itraconazol y fluconazol de 178 aislados clínicos y ambientales de *Cryptococcus neoformans*. Licenciatura de Químico Biólogo Parasitólogo. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Septiembre, 2004
57. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:107-119.
58. O'Sullivan CE, Kasai M, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Kelaher AM, Sarafandi AA, Walsh TJ. Development and validation of a quantitative real-time PCR assay using fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Aspergillus fumigatus* in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:5676–5682.
59. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Assessment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:16-22.
60. Binnicker MJ, Buckwalter SP, Eisberner JJ, Stewart RA, McCullough AE, Wohlfel SL, Wengenack NL. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2007;45:173-178.
61. Castañón-Olivares LR, Arreguín-Espinosa R, Ruiz-Palacios y Santos G, López-Martínez R. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American countries. *Rev Lat-amer Microbiol* 2000;42:35-40.
62. Castañón-Olivares LR, Sánchez Paredes E, Arreguín-Espinosa RA, Ruiz-Palacios y Santos GM, Carmona A, López Martínez AR. Aislamiento de *Cryptococcus albidus* en árboles de eucalipto. *Rev Mex Mic* 2007;25:21-25.
63. Castañón Olivares LR, Martínez Martínez K, 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.
64. Perspectiva estadística. Distrito Federal y México, 2007. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México, 2007:7-9 y 7-10.



Frequency of *Cryptococcus* Species and Varieties in México and their Comparison with some Latin American Countries

LAURA ROCÍO CASTAÑÓN-OLIVARES,¹ ROBERTO ARREGUÍN-ESPINOSA,^{2*} GUILLERMO RUIZ-PALACIOS Y SANTOS,³ AND RUBÉN LÓPEZ-MARTÍNEZ¹

Laboratorio de Micología Médica. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. UNAM.¹ Departamento de Bioquímica. Instituto de Química. UNAM.² Laboratorio de Infectología. Instituto Nacional de Nutrición Dr. Salvador Zubirán. S.S.³

*Corresponding author: Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Química. Ciudad Universitaria. Delegación Coyoacán. CP 04510. México, D. F. Tel. 5622-4565. Fax: 5616-2203. Email: arreguin@servidor.unam.mx

ABSTRACT. Cryptococcosis frequency is increasing in Mexico. Few epidemiologic and clinical surveys exist even though 10-15% of patients with AIDS develop this mycosis. To know the situation about the prevalence and etiological agents of cryptococcosis in our country, a study including isolated *Cryptococcus* spp. strains took place from 1989 to August 1998. A total of 211 *Cryptococcus* spp. strains obtained from patients of diverse hospital centers in Mexico City were studied. This study describes cryptococcosis epidemiological data, in our country. *C. neoformans* was the dominant isolation (97.15%), followed by two *C. albidus* isolations and one *C. uniguttulatus* isolation. 92.5% of the strains was isolated from cerebral spinal fluid and the remaining were from bone marrow, blood, ganglion, sputum, bronchial lavage and liver biopsy. AIDS was the principal opportunistic factor (85%). Strains were found prevails in males (87.3%). It was found that the age groups where the disease appears most frequently are in the fourth (37.5%) and third (33.8%) decade of life. Finally, the isolation frequency of the *C. neoformans* var. *neoformans* (vn) and var. *gattii* (vg) obtained in this study (vn 86.7% and vg 10.4%) was compared with the ones registered in Argentina (vn 97.6%, vg 2.4%); Brazil (vn 83.3%, vg 15.8%); Cuba (vn 97.6%, vg 2.4%); Paraguay (vn 0%, vg 100.0%); Puerto Rico (vn 100.0%, vg 0%) and Venezuela (vn 66.7%, vg 29.6%).

Key words: *Cryptococcus*, Epidemiology.

RESUMEN. La criptococosis está incrementando su frecuencia en México. Pocos estudios epidemiológicos y clínicos existen aún cuando entre el 10-15% de los pacientes con SIDA, desarrollan esta micosis. Para conocer la prevalencia y los agentes etiológicos de la criptococosis en nuestro país, se efectuó un estudio que incluyó cepas de *Cryptococcus* spp. aisladas desde 1989 hasta agosto de 1998. Un total de 211 cepas de *Cryptococcus* spp. obtenidas de pacientes atendidos en diversos centros hospitalarios ubicados en la Ciudad de México fueron estudiadas. *C. neoformans* fue el agente dominante (97.15%), seguido de *C. albidus* y *C. uniguttulatus*. El 92.5% de las cepas se aislaron a partir de líquido cefalorraquídeo y las restantes provinieron de médula ósea, sangre, ganglio, esputo, lavado broncoalveolar y biopsia de hígado. El SIDA se describió como el principal factor de oportunismo. Se encontró que la enfermedad predomina en el sexo masculino (87.3%) y en personas entre la tercera (33.8%) y cuarta (37.5%) décadas de la vida. Finalmente, la frecuencia de aislamiento de *C. neoformans* var. *neoformans* (vn) y var. *gattii* (vg) obtenida (vn 86.7% y vg 10.4%), fue comparada con la reportada en: Argentina (vn 97.6%, vg 2.4%); Brasil (vn 83.3%, vg 15.8%); Cuba (vn 97.6%, vg 2.4%); Paraguay (vn 0%, vg 100.0%); Puerto Rico (vn 100.0%, vg 0%) y Venezuela (vn 66.7%, vg 29.6%).

Palabras clave: *Cryptococcus*, Epidemiología

INTRODUCCIÓN

Cryptococcosis is a systemic disease caused by *Cryptococcus neoformans* encapsulated yeast; other *Cryptococcus* species like *C. albidus*^{17,31} and *C. laurentii*¹⁷ are oddly pathogenic in humans. The increasing incidence of cryptococcosis is caused by the immune-commitment of T cells and AIDS.¹ There are several works that have published data referring to the prevalence of the cryptococcosis mainly in

U.S.A, Australia, Japan and diverse European countries;¹⁸ nevertheless, with the exception of Brazil, few reports have presented the disease condition in Latin America. The present study was carried out retrospectively to determine the identification, and the prevalence of the species and varieties of *Cryptococcus* in isolates of patients from different hospital centers of Mexico City.

Also, the data registered in this one and other Mexican surveys,^{7,14,20} were compared with the statistics published

Table 1. Hospitals from which *Cryptococcus* spp. Strains were obtained.

Hospital	No. of strain
Centro Médico Nacional La Raza, IMSS	114
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SS	65
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS	14
Hospital Juárez, SS	4
Hospital Ignacio Zaragoza, ISSSTE	6
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, SS	3
Instituto Nacional de Pediatría, SS	2
Other Hospitals	3
Total	211

in Argentina,²⁻⁵ Brazil,^{6, 9, 19, 21, 23, 24, 26, 27} Cuba,⁹⁻¹¹ Paraguay,¹⁸ Puerto Rico¹³ and Venezuela³⁰ with the purpose of appraising the incidence of the cryptococcosis etiological agents in these Latin American countries.

MATERIALS AND METHODS

Cryptococcus sp. strains were provided by diverse hospital centers located in Mexico City (Table 1). Each one of the obtained strains were identified by means of a routine's etiological diagnosis examinations: examination in fresh with India ink, a culture media of agar dextrose Sabouraud at 30 and 37 °C, urease test, phenoloxidase test, carbon auxanogram by VITEK system and a culture media of glycine-canavanine-bromothymol blue.

Only some strains were identified by the serotype to which they belonged and this was confirmed by the Pasteur Institute of Paris, France.

Only some patients from whom the isolated were obtained, the following epidemiological data were registered: name, gender, age, occupation, place of residence, origin place, pathological product obtained and underlying disease.

RESULTS

A total of 211 *Cryptococcus* strains were studied. It was found that *C. neoformans* was the dominant isolation (97.15%), followed by two *C. albidus* and, one *C. uniguttulatus*; three *Cryptococcus* species could not be determined (Table 2). In spite of its low frequency, the finding

Table 2. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties isolated from Mexican patients with cryptococcosis.

Etiological Agent	No. of Strains (%)
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	183 (86.73)
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>	22 (10.42)
<i>Cryptococcus albidus</i>	2 (0.94)
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	1 (0.50)
<i>Cryptococcus</i> sp.	3 (0.42)
Total	211 (100.00)

of species different from *C. neoformans*, epidemiologically calls the attention, since diverse existing works^{17,31} report the isolation of *C. albidus* or *C. laurentii* as agents who, in an relevant way, attempt against the life of patients.

Regarding to strains pertaining to var. *neoformans*, only three serotypes could be identified (two serotype A and one serotype D); concerning to var. *gattii*, only one strain was serotype C, the others turned out serotype B. The presence of serotypes C and D is surprising, since a great majority of serotype C cases come from the south of California (U.S.A.) and the serotype D is predominant in the European continent.¹⁸

Regarding to pathological products from which strains were isolated: 186 were isolated from cerebral spinal fluid (CSF), seven from bone marrow, four from blood, one from ganglion, one from sputum, one from bronchial lavage and one from a liver biopsy (Table 3). In three patients, *C. neoformans* was isolated from two different sites: C.S.F. and bone marrow (in two) and C.S.F. and blood (in one). In the three cases, identification test were made to discard that, in each patient, the strains were different; when confirming (until serotype) that it was the same strain, only the corresponding to C.S.F. were entered in this study.

As far as the investigated predisposition factors: 110 of them suffered from AIDS, 18 patients apparently with no factors and seven with some immunosuppression factors different from AIDS (Table 4). These results confirm that *C. neoformans* is an opportunistic pathogen frequently found in AIDS patients, an association that becomes narrower taking into account that the systemic infection is combined with a production of capsular polysaccharides specific of *C. neoformans*, inhibitors of phagocytosis and supposedly responsible for the acute course of cryptococcosis in AIDS.⁴ However, regardless of AIDS patients, 17 out of 25 (68%) belonged to var. *gattii*, and only the remaining 32% were var. *neoformans*. These data, possibly it would reflect the Mexico situation before the AIDS era.

In relation to the distribution by gender, and based on

Table 3. Pathological products from which 201 *Cryptococcus* spp. Strains were obtained.

Etiological agent	No. of strains	Sputum	Ganglion	Liver	Bronchial Lavage	Cerebral Spinal Fluid	Bone Marrow	Blood
<i>C. albidus</i>	1	-	-	1	-	-	-	-
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	22	-	-	-	1	21	-	-
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	175	1	1	-	-	162	7	4
<i>C. uniguttulatus</i>	1	-	-	-	-	1	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp.	2	-	-	-	-	2	-	-
Total	201	1	1	1	1	186	7	4

Table 4. Predisposed factors found in 135 patients with cryptococcosis.*

Etiological agent	No. of strains	Opportunistic factors		
		None	AIDS	Non AIDS
<i>C. albidus</i>	1	-	1	-
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	18	15	1	2
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	114	3	106	5
<i>C. uniguttulatus</i>	1	-	1	-
<i>Cryptococcus</i> sp.	1	-	1	-
Total	135	18	110	7

* Data obtained by authors

Table 5. Distribution by gender in 166 patients with cryptococcosis.

Etiological agent	No. of strains	Gender	
		Female	Male
<i>C. albidus</i>	2	1	1
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	20	9	11
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	140	11	129
<i>C. uniguttulatus</i>	1	-	1
<i>Cryptococcus</i> sp.	3	-	3
Total	166	21	145

* Data obtained by authors

the studied patients, it was found that disease prevails in males in an approximated radius of 7:1 (Table 5). In relation to the registered age, it was found that the age groups where the disease appears most frequently are in the third, fourth and fifth decade of life (Table 6). Of two isolated

strains from children, it attracts the attention that one of them belonged to a new born, an outstanding epidemiologist data because, since the passage of *C. neoformans* has not been transplacentally registered up to now, in this case is very difficult to determine the infection source, taking



Table 6. Distribution by age groups from 136 patients with cryptococcosis.*

Etiological agent	No. of strains	Age groups							
		0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80
<i>C. albidus</i>	1	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	19	2	5	3	5	3	1	-	-
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	114	-	5	43	43	17	3	2	1
<i>C. uniguttulatus</i>	1	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp	1	-	-	-	1	-	-	-	-
Total	136	2	10	46	51	20	4	2	1

* Data obtained by authors

Table 7. Frequency of *Cryptococcus neoformans* varieties in some Latin American countries.

Country ^{References}	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> a / b (%)	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> a / b (%)	Not identified a / b (%)
Argentina ^{2-6, 18}	279 / 286 (97.6)	7 / 286 (2.4)	0
Brazil ^{8, 9, 18, 19, 21, 23, 24, 26, 27}	495 / 594 (83.3)	94 / 594 (15.8)	5 / 594 (0.9)
Cuba ¹⁰⁻¹²	80 / 82 (97.6)	2 / 82 (2.4)	0
Mexico ^{7, 14, 20, §}	234 / 266 (88.0)	32 / 266 (12.0)	0
Paraguay ¹⁸	0 / 1 (0)	1 / 1 (100.0)	0
Puerto Rico ¹³	12 / 12 (100.0)	0 / 12 (0)	0
Venezuela ³⁰	18 / 27 (66.7)	8 / 27 (29.6)	1 / 27 (3.7)

A, No. of strains; b, Total No. of studied strains; §, present study.

into account that, apparently, the baby could not have had contact with pigeon droppings or similar, at the hospital.

Since the prevailing species was *C. neoformans*, finally the isolation frequency of the two species varieties obtained in this study was compared with the ones registered in other countries of Latin America. It can be noted in Table 7 that *C. neoformans* var. *neoformans* counts on a greater distribution within the human cases of cryptococcosis in the general population of the countries registered.

In summary, within the interesting results, it can be found: a) one strain of *C. neoformans* var. *neoformans* serotype D, b) one strain of *C. neoformans* serotype C, c) one strain of *C. neoformans* var. *gattii* associated to AIDS, c) one strain of *C. albidus* isolated from liver, d) one strain of *C. uniguttulatus* isolated from C.S.F. and e) *C. neoformans* var. *neoformans* is the main etiologic agent of the human Cryptococcosis in Latin America, even though Brazil, Cuba, Mexico and Venezuela count on climatic conditions

that could characterize them like of tropical-subtropical climate in where, apparently, var. *gattii* would prevail.¹⁸

DISCUSSION

In spite of the low frequency with which *C. uniguttulatus* and *C. albidus* were isolated, the frequency of reports being added about the isolation of these yeasts is greater day to day. The appearance and settlement of these fungal agents, who during long time have been considered as innocuous for man, are very important because these findings reflect the great deterioration of the immune response of individuals from whom the isolated ones are obtained.

According to data obtained in Mexico, the most common clinical presentation of cryptococcosis is meningoencephalitis. In the present survey, none of the isolated ones



were obtained from urine, sperm or prostate secretion, specimens whose study is of interest because the prostate can be an asymptomatic niche, colonized by *C. neoformans* and also because the persistence of the yeast in the genitourinary tract is due to the inefficiency the antimycotic treatment has in that corporal area.¹

Most of the cryptococcosis cases, mainly caused by *C. neoformans* var. *neoformans*, are AIDS associated, as well as to other opportunist sufferings; nevertheless it is necessary to take into account the observations conducted by Arasteh *et al.*,¹ who have reported that in order to a patient with AIDS present systemic infection by *C. neoformans*, the CD4 lymphocytes count must be smaller than 150/ μ l.

On the other hand, var. *gattii* is mainly related to patients with non opportunist factors (primary cryptococcosis); in fact, this variety is exceptionally isolated from patients with AIDS, since as far as 1996 only eight cases were known at world-wide level, being the ninth one our Mexican case.⁷

Data related to gender and age surely is influenced by the amount of patients presenting AIDS, since, when having this disease as an opportunist factor, the demographic data is in terms of this factor, rather than to the cryptococcosis itself. Due to that is a retrospective study, unfortunately in this survey important epidemiological data like as foreign travels, type and response to treatment, severity or development of the disease, hospitalization time, etc., we can not recorded.

Although the cryptococcosis is a disease of a world-wide distribution, the registered data of this disease in Latin America is very poor. In addition to the countries reported in this paper, some like Aruba,²⁵ Chile,²⁶ Colombia,¹⁵ Costa Rica,²⁷ Granada,¹⁶ Jamaica,²⁸ Panama,²⁸ Peru³² and Uruguay⁸, have data published at world-wide level. However, this countries were not included in our study because they do not comment on varieties of *C. neoformans* found.

The obtained Mexican data, compared with the reported ones in other Latin countries, although to few isolates from Paraguay and Puerto Rico were studied, reflect a great similarity. Most interesting of these surveys is the high prevalence of var. *neoformans*, a variety that was not considered as a dominant one in these countries, which are considered of semitropical or tropical climate.¹⁸

From the study performed by Kwon-Chung,¹⁸ before AIDS the regions having a high prevalence of *C. neoformans* var. *gattii*, had warm temperatures ($\leq 10^{\circ}\text{C}$ in the cold season) that means, only in tropical and subtropical climates; the countries list in table 7 have this condition, nevertheless the obtained data show the high frequency of var. *neoformans*. It is clear, all data included in this study were obtained after 1980 (AIDS era), why the AIDS patients are more susceptible to var. *neoformans*, remains to be studied.

It is a fact that world-wide registers a constant increase of opportunist factors, such as: chronic diseases, immuno-

deficiencies, cortico, antibiotic and immunotherapies and organs transplanting. cryptococcosis is one of the mycosis with a high risk of being acquired by patients who have some or several of the opportunist factors above mentioned; reason why this infection should have a study priority, from a clinical viewpoint, of laboratory diagnosis and therapeutic handling.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Q.B.P. Patricia García Zaldivar of La Raza Medical Center, IMSS, and to Q.F.B. Verónica Angeles Morales of the National Institute of Neurology and Neurosurgery, SS, by their collaboration in gathering the patients strains. Thanks to Dr. Françoise Dromer, Unité de Mycologie, Institut Pasteur for your help in the serotype analysis of our *C. neoformans* strains and the confirmation of other *Cryptococcus* species. To the DGAPA, who granted financing for the present work, under agreement PAPIIT IN-215997.

REFERENCES

1. Arasteh K., F. Staib, G. Grosse, U. Futh and M. L'Age. 1996. Cryptococcosis in HIV infection of man: an epidemiological and immunological indicator? *Zbl. Bakt.* 284:153-163.
2. Bava A. J. 1987. Diferenciación en pares serotípicos de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas en nuestro medio. *Rev. Arg. Micol.* 10:12-13.
3. Bava A. J. and R. Negroni. 1990. Estudio del primer caso autóctono argentino de criptococcosis producida por *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Rev. Iberoam. Micol.* 7:39-42.
4. Bava A. J. and R. Negroni. 1992. The epidemiological characteristics of 105 cases of cryptococcosis diagnosed in the Republic of Argentina between 1981-1990. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 34:335-340
5. Bava A. J., R. Negroni, A. Arechavala, A. M. Robles and M. Bianchi. 1997. Cryptococcosis associated with AIDS in the Mufiz Hospital of Buenos Aires. *Mycopathologia* 140:13-17.
6. Calvo B., O. Fishman, A. Pignatari, R. Del Bianco and L. Zaror. 1990. Variedades y serotipos de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA y neurocriptococcosis en São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 32:480-482.
7. Castañón-Olivares L. R., R. López-Martínez, G. Barriga-Angulo and C. Ríos-Rosas. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient: first observation in Mexico. *J. Med. Vet. Mycol.* 35:57-59.
8. Conti-Diaz I. A. 1990. Highlights of cryptococcosis in Uruguay. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.* 19:83-90.
9. De Melo N. T., C. S. Lacaz, C. E. Charbel, A. D.



- Pereira, E. M. Heins-Vaccari, A. S. Franca-Netto, L. R. Machado and J. A. Livramento. 1993. Quimiotipagem de *Cryptococcus neoformans*. Revisão da literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a cryptococose. Nossa experiência com o emprego do meio de CGB. No estudo daquela levedura. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 35:469-478.
10. Fernández-Andreu C., G. Martínez-Machin, L. P. Alvarez-Bernal, R. Rodríguez-Morales and C. Alvarez-Herrera. 1990. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated in Havana City. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85:245.
11. Fernández-Andreu C., G. Martínez-Machin, J. Menéndez de San Pedro and B. Oramaz-Rodríguez. 1991. Identificación de variedades de *Cryptococcus neoformans* mediante la utilización de medios de cultivo. Rev. Cubana. Med. Trop. 43:100-103.
12. Fernández-Andreu C., G. Martínez-Machin, M. T. Illnait-Zaragozi, M. Perurena-Lancha and M. González-Miranda. 1998. The identification of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Cuban clinical isolates. Rev. Cub. Med. Trop. 50:167-169.
13. Fromstling R. A., G. K. Abruzzo and A. Ruiz. 1989. Virulence and antifungal susceptibility of environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico. Mycopathologia 106:163-166.
14. Garza-Garza D., J. L. Buendía-Urbe, E. Martínez-Cruz and B. Arguero-Liceaga. 1995. Caracterización de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Rev. Lat-amer. Microbiol. 37:273-279.
15. Greer D. L. 1978. Cryptococcosis in Colombia: epidemiological and clinical aspects. Proc. IV conference on the mycoses the black and white yeast. Pan American Health Organization. WHO. Scientific publication. 356:185-193.
16. Gutiérrez J. and J. Liebana. 1993. Immunological methods for the detection of structural components and metabolites of bacteria and fungi in blood. Ann. Biol. Clin. 51:83-90.
17. Kordonis T., A. Avlami, A. Velegraki, I. Stefanou, G. Georgakopoulos, C. Papalambrou and N. J. Legakis. 1998. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. Med. Mycol. 36: 335-339.
18. Kwon-Chung K. J. and J. E. Bennett. 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Am. J. Epidemiol. 120:123-130.
19. Lacaz C. S. and M. C. Rodrigues. 1983. Serotipagem de *Cryptococcus neoformans*. Rev. Bras. Med. 40:297-300.
20. López-Martínez R., J. L. Soto-Hernández, L. Ostrosky-Zeichner, L. R. Castañón-Olivares, V. Angeles-Morales and J. Sotelo. 1996. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observations. Mycopathologia 134:61-64.
21. Mendes C. M. F., W. Francisco, L. F. G. Siqueira and M. J. Silveira. 1989. Sorogrupagem de *Cryptococcus neoformans*. Epidemiological Note. Rev. Microbiol. S. Paulo 20:333-336.
22. Montero-Gel F. and F. Alvarado. 1978. Clinical and epidemiological aspects of cryptococcosis in Costa Rica. Proc. IV Conference on the mycoses the black and white yeast. Pan American Health Organization. WHO. Scientific publication. 356:195-198.
23. Nishikawa M. M., O. D. Sant'Anna, M. S. Lazera and B. Wanke. 1996. Use of D-proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. J. Med. Vet. Mycol. 34:365-366.
24. Paula C. R., C. H. Ito, A. Purchio, W. Gambale, B. Correa and P. S. Minami. 1988. Biochemical serotyping and other physiological characteristics of 40 *Cryptococcus neoformans* samples isolated from clinical materials in Brazil. Rev. Iberoamer. Micol. 5:105.
25. Robinson R. D. 1995. Parasitic infections associated with HIV/AIDS in the Caribbean. Bull. Pan. Am. Health Organ. 29:129-137.
26. Rozenbaum R., A. J. Rios-Goncalves, B. Wanke, M. J. Cauby, H. Clemente, M. Dos Santos Lazera, P. C. Fialho-Monteiro and A. T. Londero. 1992. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. Mycopathologia 119:133-136.
27. Rozenbaum R. and A. J. Rios-Goncalves. 1994. Clinical-epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. Clin. Infect. Dis. 18:369-380.
28. Sierra L. O., M. Suárez and A. Rodríguez-French. 1996. *Cryptococcus neoformans* meningitis in patients with AIDS in Saint Thomas Hospital. Rev. Med. Panama 21:46-50.
29. Silva-Rosas C., A. Afani, M. Fruns, M. A. Guzmán and C. Sepúlveda. 1999. Meningitis in subjects with human immunodeficiency virus infection. Neurología 14:62-66.
30. Villanueva E., M. Mendoza, E. Torres and M. B. Albornoz. 1989. Serotipificación de 27 cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas en Venezuela. Acta Científica Venezolana 40:151-154.
31. Wells G. M., A. Gajjar, T. A. Pearson, K. L. Hale and J. L. Shenep. 1998. Brief report. Pulmonary cryptosporidiosis and *Cryptococcus albidus* fungemia in a child with acute lymphocytic leukemia. Med. Pediatr. Oncol. 31: 544-546.
32. Zepa R., L. Huicho and A. Guillen. 1996. Modified India Ink preparation for *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid specimens. J. Clin. Microbiol. 34:2290-2291.

Aislamiento de *Cryptococcus albidus* en árboles de eucalipto

Laura Rocío Castañón-Olivares¹, Edith Sánchez-Paredes¹, Roberto Alejandro Arreguín-Espinosa²,
Guillermo Miguel Ruiz-Palacios y Santos³, Alfredo Carmona⁴, Rubén López-Martínez¹

¹Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Quimica, UNAM, México, D.F. ³Departamento de Infectología, Instituto Nacional de

Ciencias Médicas y Nutrición, SS, México, D.F. ⁴Laboratorio de Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Naciona
l Siglo XXI, IMSS, México, D.F.

Isolation of *Cryptococcus albidus* on eucalyptus trees

Abstract. Some *Cryptococcus* yeast species have established diverse ecological associations with plants. *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *C. laurentii*, *C. albidus*, and *C. uniguttulatus* are etiological agents of cryptococcosis, a severe mycotic infection, and of allergies in humans. The study of the natural habitat of *Cryptococcus* spp. is of medical relevance, because the habitat of these yeasts could represent a source of infection for these diseases. In this study, the presence of *Cryptococcus* spp. was investigated in *Eucalyptus* spp. trees in the National University campus, Mexico City. A total of 923 samples of leaves, flowers, and buds obtained from 135 trees during one year in four different occasions were processed in niger agar medium. The isolated fungal colonies were identified by morphological and biochemical methods. The 4179 fungal colonies obtained were identified, in order of frequency, as: *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Aureobasidium* spp., *Epitocum* spp., *Exophiala* spp., *Trichosporon* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., and *Aspergillus* spp. The only *Cryptococcus* species isolated corresponded to *C. albidus* in seven samples.

Key words: Cryptococcosis, ecology, *Eucalyptus*.

Resumen. Algunas especies de levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus*, han establecido diversas asociaciones ecológicas con sustratos vegetales. *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *C. laurentii*, *C. albidus* y *C. uniguttulatus*, son especies reconocidas como causantes de criptococosis, infección sistémica grave y de alergias, en el humano. El estudio del hábitat natural de *Cryptococcus* spp., cobra importancia médica, pues el ambiente de estas levaduras podría representar una fuente de infección para adquirir esas enfermedades. En este trabajo se investigó la presencia de levaduras de *Cryptococcus* spp. en árboles de *Eucalyptus* spp., ubicados en Ciudad Universitaria, México. Se muestrearon hojas, flores y yemas de 135 árboles durante un año en cuatro ocasiones diferentes, obteniendo un total de 923 muestras, las cuales fueron cultivadas en medio de níger. Las colonias de hongos aisladas, fueron identificadas morfológica y bioquímicamente. Se identificaron 4179 colonias de hongos que en orden decreciente de frecuencia fueron: *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Aureobasidium* spp., *Epitocum* spp., *Exophiala* spp., *Trichosporon* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. y *Aspergillus* spp. La única especie de *Cryptococcus* aislada correspondió a *C. albidus* que fue identificada en siete muestras.

Palabras clave: Criptococosis, ecología, *Eucalyptus*.

Received 21 August 2007; accepted 30 November 2007.

Recibido 21 de agosto 2007; aceptado 30 de noviembre 2007.

Autor para correspondencia: Laura Rocío Castañón Olivares
lrcastao@servidor.unam.mx

Introducción

Dentro del género *Cryptococcus* se han descrito alrededor de 30 especies, las cuales se identifican por la asimilación a diferentes carbohidratos y compuestos nitrogenados [1], por la morfología de los estados teleomorfos [10, 23] y por estudios de las secuencias parciales, obtenidas a través de ARNr [8, 10]. *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* [3, 17] y en menor frecuencia *C. albidus* [3, 5], *C. laurentii* y *C. uigugulatus* [3, 18, 21] son considerados como agentes etiológicos de la criptocosis humana.

C. albidus, *C. laurentii* y *C. neoformans* son levaduras muy ubicuas, aisladas de frutas, flores [4, 27], árboles de eucalipto y su ambiente circunvecino [6, 11, 23] del filopano (superficie foliar) de algunas plantas [13], así como también del suelo [4, 22] y materia fecal de palomas [14, 20]. Por el contrario, tanto *C. uigugulatus* como *C. gattii* son organismos con hábitats naturales limitados, el primero se ha podido aislar a partir de algunos substratos vegetales y del agua [16], mientras que el segundo se ha aislado principalmente de árboles como: *Angophora costata* y *Syncarpia glomulifera* [28], *Terminalia catapa* [2] y *Moquiáda tomentosa* [15]. Sin embargo, en Australia *C. gattii* se ha aislado principalmente en diversas especies de árboles de eucalipto: *Eucalyptus camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. rudis*, *E. gomphocephala*, *E. Nakelii* [7], concluyendo que el eucalipto es el principal reservorio de esta especie de levadura [7, 23].

Con fines de reforestación de las áreas verdes en la ciudad de México, se introdujeron desde hace un siglo, árboles de eucalipto originarios de Australia. El campus conocido como Ciudad Universitaria perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, alberga una gran población de árboles de eucalipto, siendo *Eucalyptus camaldulensis* la especie dominante y con menor frecuencia *E. (aff.) tereticornis*, *E. globulus* y *E. resinifera* [26]. Con

estos antecedentes y para contribuir al conocimiento epidemiológico de la criptocosis en nuestro país, este estudio tuvo como objetivo investigar la presencia de levaduras del género *Cryptococcus* en estos árboles de eucalipto.

Materiales y métodos

Mediante el método de números aleatorios, se seleccionaron 135 árboles sanos de *Eucalyptus* spp., localizados en ocho zonas de Ciudad Universitaria, todas con riego artificial variable. Durante un año y en cuatro ocasiones diferentes (enero, abril, junio y octubre) se tomaron fragmentos de hojas, flores y yemas de cada árbol, colectando un total de 923 muestras. En cada uno de los días de colecta, se registraron datos de temperaturas máxima y mínima, así como índices de precipitación pluvial.

Se tomaron 3 g de cada muestra, cada una de las cuales se trituraron en mortero, adicionando 10 ml de solución salina estéril con 200 U de penicilina, 400 mg de estreptomycin y 10 mg de cloranfenicol. De la suspensión obtenida, se hizo una dilución 1:100, de la cual se sembraron 10 ml en placas de agar niger [24]. Estas placas se incubaron en la oscuridad a 28 °C hasta dos semanas, haciéndose revisiones cada dos días.

La identificación de los hongos, se realizó por la morfología macroscópica de las colonias anotando aspecto, color, borde, textura y consistencia; la morfología microscópica se efectuó mediante el examen directo con azul de algodón y tinta china. Las colonias sugestivas de ser *Cryptococcus*, se resembraron nuevamente en el medio de niger, en el cual fueron purificadas, a partir de las cuales se realizaron las siguientes pruebas: crecimiento a 37°C, presencia de pigmentos melánicos en agar niger, producción de ureasas, desarrollo de cápsula en agar chocolate, sensibilidad a la cicloheximida, presencia de proteasas

mediante la hidrólisis de gelatina al 12.0%, producción de almidón, desarrollo de tubo germinativo, presencia de pigmentos en agar extracto de malta, producción de pseudomicelio en agar harina de maíz, fermentación de dextrosa y finalmente, asimilación de carbohidratos y algunos compuestos nitrogenados mediante VITEK® System (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

Resultados y discusión

Los 135 árboles estudiados, representan un muestreo estadísticamente significativo del total de los árboles de eucalipto existentes en el campus de la Ciudad Universitaria de la UNAM. Se obtuvieron 923 muestras, de las cuales se aislaron 4,179 colonias de hongos; de éstas siete fueron identificadas como *C. albidus*, mostrando las siguientes características: colonias de consistencia cremosa y color marrón claro en agar niger (Figura 1); al examen microscópico directo se observaron levaduras redondas rodeadas de cápsula de tamaño variable (Figura 2). La hidrólisis de urea y crecimiento a 37°C fueron positivos. Los



Figura 1. Colonias de *Cryptococcus albidus* en el medio de agar niger.

resultados de asimilación de carbohidratos y compuestos nitrogenados, correspondieron a *C. albidus*.

En la Tabla 1 se observa la frecuencia de aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes diferentes de *C. albidus*. Es evidente el dominio de las levaduras (*Candida* 13.1 % y *Trichosporon* 8.6 %), sobre los hongos filamentosos (*Penicillium* 7.7%, *Alternaria* 5.6 %, *Aspergillus* 4.6 %); sin embargo, *C. albidus* a diferencia de otros estudios, fue hallado en una frecuencia muy baja, lo que sugiere que el crecimiento de esta especie de levadura se ve inhibido por el desarrollo de otros hongos que compiten por el mismo sustrato.

De acuerdo a las condiciones ambientales, se observó que la temperatura y precipitación pluvial fueron diferentes en cada uno de los meses de estudio. De los siete aislados de *C. albidus*, tres fueron obtenidos en el mes de abril, dos en julio y dos en octubre. Durante el mes de enero no se aisló a esta especie (Tabla 2). La mayoría de los hongos filamentosos fueron aislados durante las estaciones de julio y octubre.

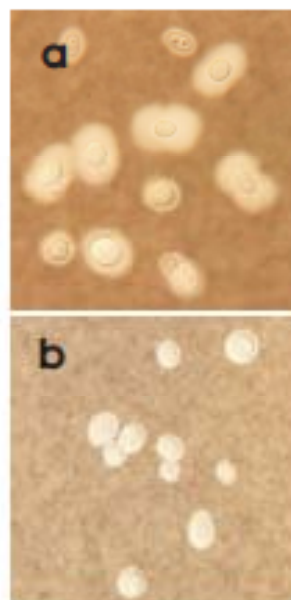


Figura 2. Microscopía de levaduras de *Cryptococcus albidus*: (a) con cápsula grande $\geq 3 \mu\text{m}$, (b) con cápsula pequeña $< 3 \mu\text{m}$. Tinción negativa de tinta china. 400 X.

Tabla 1. Frecuencia de aislamientos de diferentes géneros de hongos aislados en las 923 muestras estudiadas

Géneros	Número de colonias	%
<i>Scopulariopsis</i>	1	0.1
<i>Cryptococcus</i>	7	0.1
<i>Fusarium</i>	10	0.2
<i>Monilia</i>	15	0.4
<i>Micelia sterilia</i>	34	0.8
<i>Cladosporium</i>	76	1.8
<i>Zygosporium</i>	79	1.9
<i>Trichadium</i>	110	2.7
<i>Mucorales</i>	120	2.9
<i>Rhodotrypa</i>	121	2.9
<i>Sporobolomyces</i>	191	4.6
<i>Aspergillus</i>	191	4.6
<i>Alternaria</i>	232	5.6
<i>Penicillium</i>	318	7.7
<i>Trichosporon</i>	358	8.6
<i>Exophiala</i>	394	9.4
<i>Epicoccum</i>	407	9.7
<i>Aureobasidium</i>	407	9.7
<i>Candida</i>	551	13.1
<i>Saccharomyces</i>	557	13.3
TOTAL	4,179	100

A diferencia de lo reportado en Australia en zonas boscosas, en ninguno de los árboles analizados en este estudio, se aisló *C. gattii*. Lo anterior puede deberse a que la Ciudad Universitaria es una zona altamente perturbada, debido a las modificaciones urbanas del lugar. Es importante continuar con la búsqueda de la fuente ambiental natural de *C. gattii* debido a que continúa el reporte de casos de criptococosis, causados por esta especie, en nuestra ciudad [3, 17].

Los siete aislamientos de *C. albidus*, presentaron: cápsula, pigmentos melánicos y termotolerancia a 37°C, características que en *C. neoformans* se han comprobado como factores de virulencia y que se desconocían en *C. albidus* [12, 25] que había sido considerado como inócua. Asimismo se ha demostrado que algunas cepas de *C. albidus* aisladas de la naturaleza, presentan mayor resistencia a los antifúngicos, que las aisladas de casos clínicos [9]. Estas características de patogenicidad están estrechamente

Tabla 2. Datos promedio de algunos factores ambientales prevalentes en los días de la colecta

Meses	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Precipitación pluvial (mm)
Abril	28.0	12.5	0.4
Julio	28.6	11.9	6.6
Octubre	22.9	7.1	0.03
Enero	24.4	2.8	0

asociadas a la dinámica de infección, por lo que resulta interesante considerar a los árboles de eucalipto como fuentes potenciales de infección.

Por otra parte se ha demostrado que *C. albidus* es causante de la neumonitis alérgica del verano [19], al igual que muchos otros de los hongos identificados en los materiales vegetales, por lo anterior podría deducirse que los árboles de eucalipto fungen como fuentes importantes de alergenofúngicos.

En nuestro país, la criptococosis sigue ocupando un lugar importante como causa de morbilidad y mortalidad, sobre todo en pacientes con SIDA, por lo que siguen siendo prioritarios los estudios para describir nuevos hábitats de las especies de *Cryptococcus* y por consiguiente las fuentes de infección potenciales de esta levadura.

Agradecimientos

Al Maestro Antonio Camacho del Centro Meteorológico Universitario de la Facultad de Filosofía y Letras de la UNAM por su ayuda en la medición de los datos climatológicos; al actuario Jaime García Romero del Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM, por su asesoría en la selección, por número salentorios, de una muestra representativa de los eucaliptos de Ciudad Universitaria. Este trabajo fue realizado con financiamiento de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM, bajo el convenio PAPIIT IN-215997.

Literatura citada

1. Barnett, J.A., R.W. Payne, D. Yarrow, 2000. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
2. Callejas, A., N. Ondóñez, M.C. Rodríguez, E. Castañeda, 1998. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *guttii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Medical Mycology* 36:341-344.
3. Castañón-Olivares, L.R., R. Arreguín-Espinosa, G. Ruiz-Palacios y Santos, R. López-Martínez, 2000. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin-american countries. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:35-40.
4. De Azeredo, L.A., E.A. Gomes, L.C. Mendonça-Hagler, A.N. Hagler, 1998. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *International Microbiology* 1:205-208.
5. De Castro, L.R., O.A. Saenz, J.M. Lally, H.P. Sandoval, K.D. Solomon, D.T. Vroman, 2005. *Cryptococcus albida* keratitis after corneal transplantation. *Cornea* 24:882-883.
6. Duarte A., N. Ondóñez, E. Castañeda, 1994. Association of yeast of the *Cryptococcus* genus with *Eucalyptus* species in Santafé de Bogotá. *Revista del Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 36:125-130.
7. Ellis, D.H., T.J. Pfeiffer, 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *guttii*. *Journal of Clinical Microbiology* 28:1642-1644.
8. Fonseca, A., G. Scorzetti, J.W. Fell, 2000. Diversity in the yeast *Cryptococcus albida* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 46:7-27.
9. García-Martos, P., J.F. Novak, A. García-Tapia, P. Maiz, J.L. Puerto, A. Sepúlveda, 2002. Susceptibility to antifungal agents of *Cryptococcus* species of clinical interest. *Medicina Clínica* 119:211-213.
10. Guého, E., L. Impropizi, R. Christen, G.S. De Hoog, 1993. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeast determined from partial large subunit rRNA sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63:175.
11. Haraoka, A.M., S.T. Yildiz, A. Grolum, M.A. Sarschi, L. Doganci, 2004. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia* 158:195-199.
12. Konda, R., T. Sugita, E.S. Jacobson, T. Shimoda, 2002. La coccidiosis and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* 40:1214-1218.
13. Inacio, J., P. Ferraz, M. de Carvalho, A. Fonseca, M.T. Arnaud-Collaco, I. Spencer-Martins, 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobion on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* 44:344-353.
14. Karlstein, P., H. Hohen, A. Schmalz, D. Khuschabj, W. Glawatschnig, 2000. Occurrence of *Cryptococcus* spp. in excreta of pigeons and pet birds. *Mycoses* 43:7-15.
15. Lazzari, M., M. Cavalcanti, L. Trilles, M. Nishikawa, B. Wanke, 1998. *Cryptococcus neoformans* var. *guttii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Medical Mycology* 36:112-119.
16. Libkind, D., P. Ferraz, R. Sommeruga, M.C. Dinguez, M. Ferraro, S. Brizio, H. Zappare, M. Van Brock, 2004. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochemical Photobiological Sciences* 3:281-286.
17. López-Martínez, R., J.L. Soto-Hernández, L. Ostrosky-Zeichner, L.R. Castañón-Olivares, V. Angeles-Monreal, J. Sotelo, 1996. *Cryptococcus neoformans* var. *guttii* among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observations. *Mycopathologia* 134:61-64.
18. McCurdy, L.H., J.D. Morrow, 2001. Ventriculitis due to *Cryptococcus trigatharum*. *Southern Medical Journal* 94:65-66.
19. Miyagawa, T., S. Hamagami, N. Tanigawa, 2000. *Cryptococcus albida*-induced summer-type hypersensitivity pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161:961-966.
20. Rosario, I., M. Herraiz de Mendoza, S. Demir, G. Soro, I. Alamo, B. Acosta, 2005. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses* 48:421-424.
21. Simon, G., G. Simon, M. Enko, L. Marni, 2005. Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a nine-year-old boy with X-linked hyperimmunoglobulin M syndrome. *Pediatric Infectious Disease Journal* 24:935-937.
22. Skvikova, E., R. Valkentiova, 2003. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal of Basic Microbiology* 43:430-436.
23. Sorrell, T.C., D.H. Ellis, 1997. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:42-43.
24. Skub, F., H. P. R. Seelinger, 1996. Un nouveau milieu sélectif pour l'isolement de *C. neoformans* des matières fécales et du sol. *Annales de l'Institut Pasteur* 110:792-793.
25. Sugita, T., M. Takashiro, R. Konda, T. Nakase, T. Shimoda, 2001. Intraspecific diversity of *Cryptococcus albida* isolated from humans as revealed by sequences of the internal transcribed spacer regions. *Microbiology and Immunology* 45:291-297.
26. Tirmezo, T., M.E. Cortés, S. Segura, B. Torres, Y. Osalde, L. Villaseca, J.V. Tapia, 1995. La vegetación urbana del campus universitario y la polinización del eucalipto. Programa de mejoramiento de las áreas verdes del campus universitario. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.
27. Trindade, R.C., M.A. Resende, C.M. Silva, C.A. Rosa, 2002. Yeast associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology* 25:294-300.
28. Vilcins, I., M. Kriekemeyer, H. Agui, D. Carter, 2002. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *guttii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. *Medical Mycology* 40:53-60.

Short communication

Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting

L. R. CASTAÑÓN OLIVARES*, K. MARTÍNEZ MARTÍNEZ*, R. M. BERMÚDEZ CRUZ†, M. A. MARTÍNEZ RIVERA‡, W. MEYER§, R. A. ARREGUÍN ESPINOSA+, R. LÓPEZ MARTÍNEZ* & G. M. RUIZ PALACIOS Y SANTOS^

*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal (D. F.) México, †Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, D. F. México, ‡Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, D. F. México, §Molecular Mycology Research Laboratory University of Sydney Western Clinical School at Westmead Hospital, Westmead Millennium Institute, Sydney, Australia +Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. México, and ^Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Secretaría de Salud, D. F. México

Cryptococcosis in México is caused by both species of the *Cryptococcus* species complex i.e., *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. The current study was aimed to determine genetic variability of 72 Mexican clinical isolates using PCR-fingerprinting with the primer M13. PCR fingerprinting revealed 55 VNI, five VNII, three VNIII, one VNIV, two VGI, two VGII, two VGIII and two VGIV isolates among those studied. The results show that most cryptococcosis cases in México are AIDS related and are caused by *C. neoformans* var. *grubii*, genotypes VNI and VNII. In addition this study revealed for the first time the presence of genotypes VNIV and VGII among Mexican clinical isolates. The present data show that all genotypes that have been described for the *Cryptococcus* species complex are found in México, indicating a much wider geographic distribution of genotypes than previously reported. The molecular analysis of Mexican cryptococcal isolates generated PCR-fingerprinting patterns which will provide references for future typing studies to allow the integration of Mexican cryptococcal genotypes into the ongoing global genotyping study of the *Cryptococcus* species complex.

Keywords Cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, México, PCR-fingerprinting, genotyping

Introduction

Human cryptococcosis is a mycosis with a worldwide distribution, affecting both immunocompetent and immunocompromised individuals. In the last two decades, cryptococcosis has become the second most

common fungal disease in AIDS patients [1]. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*, the etiological agents of cryptococcosis [2], display great differences in clinical, ecological [3], epidemiological [4,5], biochemical and molecular features [6,7]. PCR-fingerprinting and AFLP analysis has indicated eight major genotypes within the *Cryptococcus* species complex, i.e., VNI and VNII (*C. neoformans* var. *grubii*, serotype A), VNIII (serotype AD hybrid), VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*), VGI, VGII, VGIII and VGIV (*C. gattii*, serotypes B and C) [4,8].

Although the frequency of this mycosis has decreased in the last years, severe cases are still reported

Received 23 December 2007; Final revision received 21 August 2008; Accepted 16 October 2008
Correspondence: Laura Rocío Castañón Olivares, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología, 2° piso Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Distrito Federal, México, C. P. 04510. Tel/Fax: +52 55 5623 2458, E-mail: lrocastao@servidor.unam.mx

in México. In a study at a national reference hospital, *Cryptococcus* spp. were isolated from 9.8% of 2,940 cases of meningoencephalitis seen in the period between 1980–2004 [9] and both *C. neoformans* and *C. gattii* have been isolated from Mexican patients [10].

In order to investigate, for the first time, the distribution of the genotypes of the *Cryptococcus* species complex in México we have performed an epidemiological study using PCR-fingerprinting with 72 *C. neoformans* and *C. gattii* isolates (Table 1).

Materials and methods

This retrospective study included 72 isolates from 72 patients admitted from 1994 to 2004 to three reference hospitals in the Distrito Federal (Mexico, City). To allow a correlation with the genetic variation found globally, five isolates from Spain, four from Colombia, one from Canada, two from South Africa, one from Australia and one from the USA were also included in the current study. Eight reference strains (WM148 (VNI), WM626 (VNII), WM628 (VNIII), WM629 (VNIV), WM179 (VGI), WM178 (VGII), WM175 (VGIII) and WM779 (VGIV)) were used to allow the determination of the eight major molecular types within the *Cryptococcus* species complex [4]. The isolates were identified on the basis of capsule size, directly measured from the specimens of patients, colonial morphology on Sabouraud dextrose agar, positive urea and laccase tests [11], growth in glycine-canavanine-bromothymol blue agar (CGB) [12] and agar with D-proline [13]. In some cases the serotyping was performed with Crypto-Check kit[®] according to the manufacturer's instructions.

Susceptibility to ketoconazole, itraconazole, fluconazole, amphotericin B and caspofungin was carried out by the standard broth microdilution method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards) M27-A2 [14]. The ranges of antifungal concentrations used were 16–0.03 µg/ml for amphotericin B, itraconazole, ketoconazole and caspofungin and 128–0.025 µg/ml for fluconazole [14]. As the breakpoint susceptibility values have not yet been formally proposed by the NCCLS M27-A2 for *C. neoformans*, we took into account the approaches recommended by diverse number of authors [15–18]. Resistance to antifungal agents considered to occur for: ketoconazole and itraconazole at ≥ 1 µg/ml; amphotericin B ≥ 2 µg/ml; caspofungin ≥ 3 µg/ml; and for fluconazole ≥ 64 µg/ml. The MIC end points were defined as the lowest concentration of drug which resulted in a complete inhibition of visible growth

(50% for fluconazole, itraconazole, ketoconazole and 90–100% for caspofungin and amphotericin B).

Genomic DNA was extracted from all cryptococcal isolates with the DNeasy Plant Mini Kit[®] (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the supplier's directions. PCR fingerprinting with the microsatellite specific primer of the M13 core sequence was performed as described by Meyer *et al.* [4]. Amplification products were separated by electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. All reactions were run in triplicate.

To analyze the PCR fingerprinting patterns, the software GelCompar I version 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) was used. The similarity matrix and clustering dendrograms were calculated using the Jaccard coefficient and UPGMA algorithm, respectively (maximum tolerance 1.0%).

Results

The patient population contained 15% females and 85% males, resulting in a female/male proportion of 1:5. The patient age ranged from 10–73 years (mean = 34 years) and most came from areas with an average temperature of 13°C.

All isolates were positive in the urease and laccase tests. Growth on CGB and D-proline media identified sixty-three isolates as *C. neoformans* and nine as *C. gattii*. Only 18 out of the 72 Mexican isolates presented a small capsule (1–4 µm diameter thickness) and produced non-mucous colonies.

All 72 isolates were susceptible to azoles. According to the MIC_{50%} found, isolates were divided in two groups; 0.03–0.12 µg/ml (68/72) and 0.5 µg/ml (4/72) for ketoconazole and 0.25–1 µg/ml (5/72), and 2–32 µg/ml (67/72) for fluconazole. All isolates were susceptible to itraconazole within the range of 0.03–0.125 µg/ml. Likewise, all isolates were susceptible to amphotericin B MIC_{50%} (0.03–0.5 µg/ml) and resistant to caspofungin (16 µg/ml 63/72, and 32 µg/ml 9/72). Within the 72 Mexican isolates we found all eight major genotypes of the *Cryptococcus* species complex previously reported [4]. The frequency of genotype was as follows; 55 isolates were VNI, five VNII, three VNIII, one VNIV, two VGI, two VGII, two VGIII and two VGIV (Fig. 1 and 2). All VN genotypes were isolated from patients with AIDS and all VG genotypes were isolated from non-AIDS patients (Fisher's exact test $P < 0.001$).

Of special interest is the fact that we identified for the first time the presence of molecular types VNIV and VGII among Mexican cryptococcal isolates. In respect to the geographic distribution, the *C. gattii* VG

Table 1 Characteristics of the studied isolates.

Isolate	Sex	Age	Resid	Sample	Risk factor	Capsule size	Colonial morphology	CGB	D-Proline	Serotype	Genotype
UNAM68	M	20	MOR	CSF	None	15 µm	typical	gattii	gattii	B	VGI
UNAM69	F	47	MIC/DF	CSF	None	3 µm	atypical	gattii	gattii	B	VGI
UNAM66	F	18	GUE	CSF	None	13 µm	typical	gattii	gattii	B	VGI
UNAM67	M	20	MEX	CSF	None	18 µm	typical	gattii	gattii	B	VGII
UNAM72	F	34	MEX	CSF	None	3 µm	atypical	gattii	gattii	B	VGIII
UNAM73	F	10	MEX	CSF	None	2 µm	atypical	gattii	gattii	B	VGIII
UNAM70	M	49	U	CSF	Liver insufficiency	4 µm	atypical	gattii	gattii	C	VGIV
UNAM71	M	35	MEX	CSF	Hypophysis adenome	3 µm	atypical	gattii	gattii	B	VGIV
UNAM65	M	40	U	CSF	HIV	16 µm	typical	gattii	gattii	D	VNTV
UNAM64	M	35	U	CSF	U	14 µm	typical	neof	neof	U	VNIII
UNAM63	F	27	DF/MEX	CSF	HIV	13 µm	typical	neof	neof	U	VNIII
UNAM62	U	U	U	Blood	U	13 µm	typical	neof	neof	U	VNIII
UNAM61	M	30	U	CSF	HIV	11 µm	typical	neof	neof	A	VNII
UNAM60	M	46	U	CSF	Tuberculosis+ lymphocytosis	1 µm	atypical	neof	neof	U	VNII
UNAM59	M	26	DF	CSF	HIV	1 µm	atypical	neof	neof	U	VNII
UNAM58	M	27	DF	CSF	HIV	3 µm	atypical	neof	neof	A	VNII
UNAM57	M	46	MEX/DF	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNII
UNAM56	M	34	U	CSF	HIV	3 µm	atypical	neof	neof	U	VNI
UNAM55	M	27	U	CSF	U	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM54	M	34	U	CSF	U	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM53	M	30	U	CSF	U	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM52	M	36	U	CSF	HIV	13 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM51	M	26	U	CSF	HIV	17 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM50	M	19	U	CSF	U	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM49	M	31	U	CSF	HIV	3 µm	atypical	neof	neof	U	VNI
UNAM48	M	36	U	CSF	HIV	17 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM47	M	34	U	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM46	M	27	U	CSF	HIV	15 µm	typical	neof	neof	A	VNI
UNAM45	M	50	U	CSF	HIV	18 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM44	M	28	U	CSF	HIV	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM43	M	27	U	CSF	HIV	1 µm	atypical	neof	neof	U	VNI
UNAM42	M	37	U	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM41	M	32	U	CSF	HIV	1 µm	atypical	neof	neof	U	VNI
UNAM39	M	49	U	CSF	HIV	18 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM38	M	53	U	CSF	Vasculitis	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM37	M	28	U	CSF	HIV	13 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM36	M	24	U	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM35	M	31	U	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM34	M	38	U	CSF	HIV	12 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM33	M	U	U	Blood	U	18 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM32	M	U	U	CSF	Herpes	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM31	F	30	U	CSF	U	14 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM30	F	U	U	Blood	U	2 µm	atypical	neof	neof	U	VNI

Table 1 (Continued)

Isolate	Sex	Age	Resid	Sample	Risk factor	Capsule size	Colonial morphology	CGB	D-Proline	Serotype	Genotype
UNAM29	U	U	U	BM	U	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM28	M	25	DF	CSF	HIV	14 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM27	F	27	DF	CSF	U	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM26	M	32	DF	BM	HIV	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM25	M	27	DF	CSF	HIV	18 µm	typical	neof	neof	A	VNI
UNAM24	M	29	DF	CSF	HIV	3 µm	atypical	neof	neof	A	VNI
UNAM23	M	26	DF	CSF	HIV	15 µm	typical	neof	neof	A	VNI
UNAM22	M	34	DF	CSF	HIV	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM21	M	32	DF	CSF	HIV	2 µm	atypical	neof	neof	U	VNI
UNAM20	M	38	DF	CSF	HIV	12 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM19	M	50	DF	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM18	M	41	DF	CSF	HIV	13 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM17	M	39	MEX	CSF	HIV	14 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM16	M	33	MEX	CSF	HIV	12 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM15	M	47	MEX	CSF	HIV	2 µm	atypical	neof	neof	U	VNI
UNAM14	F	52	MEX	CSF	HIV	10 µm	typical	neof	neof	A	VNI
UNAM13	M	39	MEX	CSF	HIV	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM12	M	20	MEX	CSF	HIV	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM11	F	35	MEX	CSF	HIV	15 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM10	M	32	MEX	CSF	HIV	17 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM09	M	24	GUE	CSF	HIV	18 µm	typical	neof	neof	A	VNI
UNAM08	M	29	HGO	CSF	HIV	3 µm	atypical	neof	neof	U	VNI
UNAM07	F	22	MIC	CSF	HIV	18 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM06	M	73	MOR	CSF	U	10 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM05	M	35	GTO/DF	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM04	M	44	DF/MEX	CSF	HIV	18 µm	typical	neof	neof	A	VNI
UNAM03	M	48	DF/MEX	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
UNAM02	M	32	DF/BC/ USA	CSF	HIV	1 µm	atypical	neof	neof	U	VNI
UNAM01	M	51	TAM/ MOR	CSF	HIV	16 µm	typical	neof	neof	U	VNI
IMMIM14c	U	U	Spain	U	U	U	U	neof	neof	U	VNI
IMMIM16c	U	U	Spain	U	U	U	U	neof	neof	U	VNI
IMMIM17c	U	U	Spain	U	U	U	U	neof	neof	U	VNI
IMMIM18c	U	U	Spain	U	U	U	U	neof	neof	U	VNI
IMMIM15c	U	U	Spain	U	U	U	U	neof	neof	U	VNII
INS936	U	U	Colombia	U	HIV	U	U	neof	neof	A	VNI
INS1177	U	U	Colombia	U	HIV	U	U	neof	neof	A	VNI
INS762	U	U	Colombia	U	U	U	U	gattii	gattii	B	VGII
INS1134	U	U	Colombia	U	U	U	U	gattii	gattii	B	VGIII
WM2.288 (RB8)	U	U	Canada	U	Environmental	U	U	gattii	gattii	B	VGII
Colter	U	U	Australia	U	U	U	U	gattii	gattii	B	VGII
M27055	U	U	South Africa	U	U	U	U	gattii	gattii	C	VGIV

Table 1 (Continued)

Isolate	Sex	Age	Resid	Sample	Risk factor	Capsule size	Colonial morphology	CGB	D-Proline	Serotype	Genotype
King Cheetah	U	U	South Africa	U	Veterinary	U	U	<i>gattii</i>	<i>gattii</i>	C	VGIV
B3178	U	U	USA	U	U	U	U	<i>neof</i>	<i>neof</i>	D	VNIV
RS (WM148)	U	U	Australia	U	U	U	U	<i>neof</i>	<i>neof</i>	A	VNI
RS (WM626)	U	U	Australia	U	U	U	U	<i>neof</i>	<i>neof</i>	A	VNII
RS (WM628)	U	U	Australia	U	U	U	U	<i>neof</i>	<i>neof</i>	AD	VNIII
RS (WM629)	U	U	Australia	U	U	U	U	<i>neof</i>	<i>neof</i>	D	VNIV
RS (WM179)	U	U	Australia	U	U	U	U	<i>gattii</i>	<i>gattii</i>	B	VG I
RS (WM178)	U	U	Australia	U	U	U	U	<i>gattii</i>	<i>gattii</i>	B	VG II
RS (WM175)	U	U	USA	U	U	U	U	<i>gattii</i>	<i>gattii</i>	B	VG III
RS (WM779)	U	U	South Africa	U	U	U	U	<i>gattii</i>	<i>gattii</i>	C	VGIV

UNAM = Universidad Nacional Autónoma de México

IMMIM = Instituto Municipal de Investigaciones Médicas, Barcelona

INS = Instituto Nacional de Salud, Bogotá

RS (WM) = Reference strain (Westmead Hospital, Wieland Meyer)

BC = Baja California State

DF = Distrito Federal (Mexico City)

GTO = Guanajuato State fluid

GUE = Guerrero State

HGO = Hidalgo State

MEX = México State

MIC = Michoacán State

MOR = Morelos State

TAM = Tamaulipas State

USA = United States of America

BM = Bone marrow

CSF = Cerebrospinal

HIV = Human immunodeficiency Virus

U = Data unknown

Typical colony morphology = Mucoid, wet and bright appearance

Atypical colony morphology = Dry and opaque appearance

neof = *Cryptococcus neoformans* (including var. *grubii*, var. *neoformans* and the AD hybrid)*gattii* = *Cryptococcus gattii*

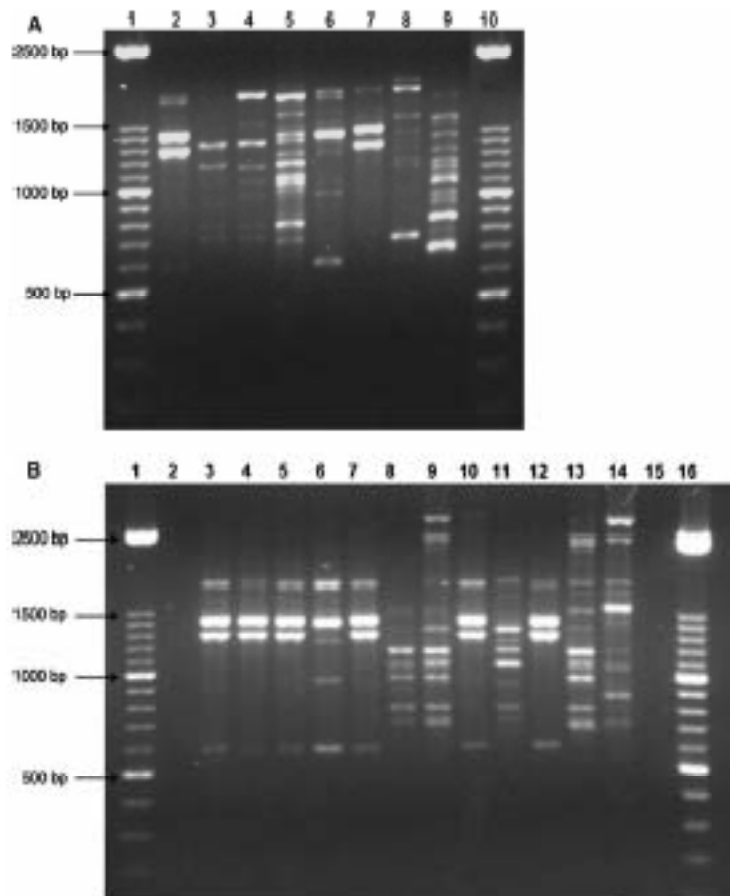


Fig. 1 (A) PCR-fingerprinting analysis of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* reference strains. Lanes 1 and 10: 100 bp DNA ladder, DNA molecular weight marker (MWXIV, Roche Applied Science, Indianapolis, USA), lane 2: VNIA/FLP1 (WM148), lane 3: VGIII/FLP5 (WM175), lane 4: VGIIA/FLP6 (WM178), lane 5: VGIA/FLP4 (WM179), lane 6: VNII/FLP1A (WM626), lane 7: VNIII/FLP3 (WM628), lane 8: VNIV/FLP2 (WM629), and lane 9: VGIV/FLP7 (WM779). (B) Examples of PCR-fingerprinting patterns found in Mexican clinical isolates. Lanes 1 and 16: 100 bp DNA ladder; lanes 2 and 15: negative control; lane 3: UNAM54 (VNI); lane 4: UNAM53 (VNI); lane 5: UNAM52 (VNI); lane 6: UNAM60 (VNII); lane 7: UNAM51 (VNI); lane 8: INS762 (VGII); lane 9: UNAM66 (VGII); lane 10: UNAM50 (VNI); lane 11: UNAM72 (VGIII); lane 12: UNAM49 (VNI); lane 13: UNAM67 (VGII) and lane 14: UNAM70 (VGIV).

genotypes were mainly obtained from patients residing in medium-dry and warm climates.

In general the CGB and D-proline assimilation techniques correlated well with the clustering of the isolates into VN or VG genotypes (Fisher's exact test $P < 0.001$). However, there was one exception, i.e., an isolate with the genotype VNIV (serotype D) which was resistant to canavanine and biochemically identified as *C. gattii*. This suggests that although the biochemical tests are very specific, the molecular analysis can identify possible hybrid strains.

The following genotypes were identified among the 14 non-Mexican isolates; VNI and VNII for isolates

from Spain, VNI, VGII and VGIII for those recovered in Colombia, VGII from Canada, VGII from Australia, VGIV observed from South Africa and VNIV for the one isolate obtained from the USA (Fig. 2).

Discussion

PCR fingerprinting revealed that the distribution of the genotypes among isolates of the *Cryptococcus* species complex in México is correlated with the species, varieties and serotypes of these yeasts, as well as their association with AIDS patients.

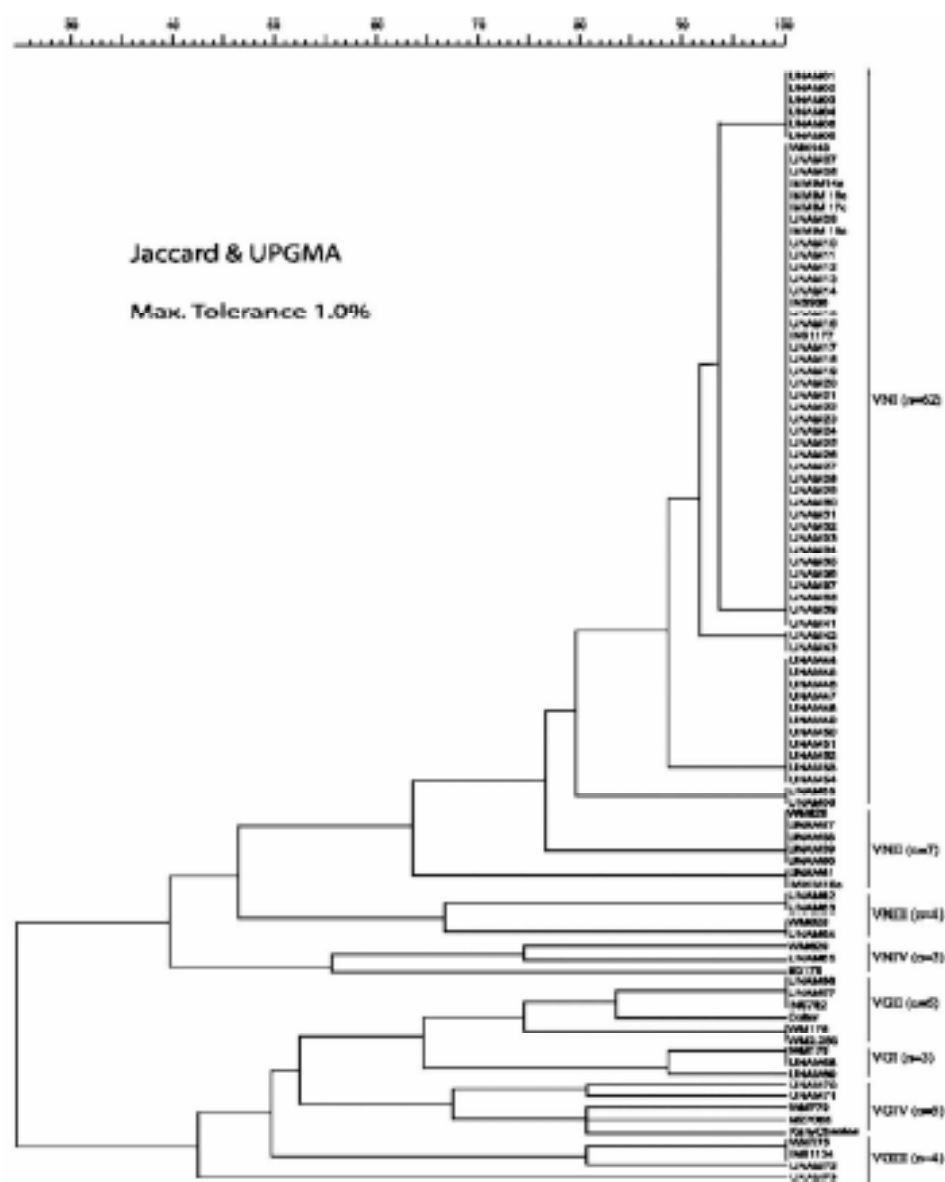


Fig. 2. Phenogram of PCR fingerprinting profiles obtained from 72 Mexican, five Spanish, four Colombian, one from Canada, two from South Africa, one from Australia and one USA *Cryptococcus* isolates with the primer M13, created with the program GelCompar I.

Gender, age and geographical origin of the patients from which the yeasts were isolated, as well as the morphology and antifungal susceptibility are characteristics that did not correlate with the frequency and distribution of the genotypes.

The results obtained in this survey show that the majority of Mexican cryptococcosis cases are caused by

the genotypes VNI and VNII, as is also the case in other countries. However, the presence of genotypes VNIV and VGI in Mexico, which are considered having a restricted distribution, is noteworthy. Our findings open up the unique possibility to include the newly discovered VGII strains from México in a more global population genetic analysis to investigate the

possibility of México being a link between South America and the ongoing cryptococcosis outbreak on Vancouver Island, Canada [3,7].

The finding of a genotype VNIV, serotype D strain, which was erroneously identified as *C. gattii*, might indicate the occurrence of hybrids between *C. neoformans* var. *neoformans* and *C. gattii* in México as has been reported from two Dutch patients [19]. How these hybrid strains were actually formed remains to be elucidated, but the hypothesis is a somatic fusion followed by karyogamy of a MAT α serotype B cell and a MAT α serotype D cell [19]. Considering the great epidemiology interest in such an occurrence, we are currently undertaking a more detailed molecular analysis of this strain to confirm our findings.

The identification of *C. gattii* from medium-dry and warm climates in México confirms once again that the distribution of *C. gattii* is not restricted to tropical and subtropical zones as it had been traditionally been considered. However to complete this epidemiological study it is necessary to investigate the genotypes of environmental isolates and the travel history of our patients.

All genotypes previously described in the literature were identified among the Mexican isolates included in this analysis. This is important because it suggests that the genotype distribution has a much wider territorial extension than previously reported [4].

The results obtained in this work will allow a wider range of local laboratories to carry out molecular typing in México, using PCR fingerprint patterns under standardized conditions, as well as characterizing autochthonous isolates to establish Mexican reference strains. The next goal in cryptococcal research in México is the selection of other specific and reproducible methods to identify reliable biological markers that will allow; (a) the determination of genotype similarities and differences among clinical and environmental isolates, (b) the identification of the sources of human infections, (c) the creation of molecular tools for rapid diagnosis, and (d) the enlargement of our global biogeographical knowledge of these yeasts.

Acknowledgements

We gratefully recognize the collaboration of Gustavo Barriga, Patricia García Zaldívar, Rosa María Cervantes Tovar, Verónica Angeles, José Luis Soto, Alfredo Carmona, Joseph Torres, Elizabeth Castañeda, Françoise Dromer, Luisa Díaz, Karl Clemons, Leonel Mendoza, Pilar Ramos and Violeta Ibarra, for their valuable academic orientation. This work was supported by the Dirección General de Asuntos del

Personal Académico de la UNAM, which provided financing support for the present investigation (PAPIIT IN-215997).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- 1 Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 507-544.
- 2 Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacilliformis* (Basidiomycota, Hymenozymozetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 2002; 51: 804-806.
- 3 Granados DP, Castañeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 636-644.
- 4 Meyer W, Castañeda A, Jackson S, et al. Molecular typing of Indo-American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 189-195.
- 5 Butler MI, Butler RTM. The PRP8 intron in *Cryptococcus* as a source of phylogenetic and epidemiological information. *Fungal Genet Biol* 2005; 42: 452-463.
- 6 Litvinova AP, Lin X, Templeton I, Heitman J, Mitchell TG. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa. *PLoS Pathog* 2007; 3: 1109-1117.
- 7 Bowers M, Hagen F, Karamae EE, Boekhout T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol* 2008; 45: 400-421.
- 8 Boekhout T, Theelen B, Diaz M, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2001; 147: 891-907.
- 9 Barriga Angulo G, Asanir Escobar 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.
- 10 Castañeda-Olivares LR, Arraquin-Espinosa R, Ruiz-Palacios y Santos G, López-Martínez R. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American countries. *Rev Lat-Am Microbiol* 2000; 42: 35-40.
- 11 Raub F, Seibold M, Antweiler E, Fohlich B. Raub agar supplemented with a triple antibiotic combination for the detection of *Cryptococcus neoformans* in clinical specimens. *Mycoses* 1989; 32: 448-454.
- 12 Kwon-Chung KJ, Brlacheck 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: 535-537.
- 13 Dufait R, Velho R, De Vooey C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mycotax* 1987; 30: 483.
- 14 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard (M27-A2), 2nd edn. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.
- 15 Feldmeier M, Kuss Y, Mohrnick A, Casadevall A. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan

- synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis* 2000; **182**: 1791-1795.
- 16 Alter AJ, Martín-Mazuelos E, Letano F, et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1544-1548.
- 17 Franzot SP, Hamdan JS. *In vitro* susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 822-824.
- 18 Rex JH, Pfaller A, Galgiani JN, et al. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro* - *in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997; **24**: 325-347.
- 19 Bovers M, Hagen F, Kammae EE, et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res* 2006; **6**: 599-607.