

## Tipificación molecular y susceptibilidad *in vitro* frente a fluconazol de aislamientos clínicos costarricenses del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*

Daniela Jaikel-Viquez,<sup>1,2,\*</sup> Lorena Uribe-Lorío,<sup>3</sup> Norma T. Gross.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sección de Micología Médica, Departamento de Microbiología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

Rev Panam Enf Inf 2018; 1(1):12-20.

Received 30 October 2017 - Accepted 30 August 2018.

Copyright © 2018 Jaikel-Viquez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Resumen

**Introducción:** La criptococosis es una infección micótica oportunista causada por el complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. El objetivo del trabajo fue determinar los patrones moleculares del complejo *C. neoformans/C. gattii* de aislamientos clínicos y su susceptibilidad *in vitro* al fluconazol (FL). **Métodos:** Se analizaron los expedientes clínicos de 74 pacientes diagnosticados con criptococosis, entre el 2011 y el 2014. Los aislamientos obtenidos fueron caracterizados: (i) fenotípicamente mediante el sistema automatizado Vitek® (BioMérieux, Francia), la prueba de la ureasa, la prueba de la fenil oxidasa y la inoculación en medio canavanina-glicina y azul de bromotimol (ii) genéticamente mediante la restricción enzimática del gen *URA5* con las enzimas Sau96I y HhaI y (iii) de acuerdo a su patrón de susceptibilidad *in vitro* al FL mediante la técnica de microdilución en medio líquido. **Resultados:** Se encontró que la mayoría de los pacientes eran de sexo masculino (86.5 %), con una edad promedio de 43.5 años, VIH positivos (75.7 %) y que ingresaron al centro médico con un cuadro de meningitis criptocócica. Con respecto a la caracterización fenotípica y genotípica se encontró que el 93.2 % de los aislamientos pertenecían al genotipo VNI, el 5.4 % al VNII y el 1.4 % a la especie *Cryptococcus laurentii*. Además, todas las levaduras analizadas fueron sensibles al FL. **Conclusiones:** Se demostró por primera vez en Costa Rica el predominio de *C. neoformans* var. *grubii* VNI, en aislamientos clínicos, y que la resistencia no constituye un problema entre los aislamientos estudiados.

**Palabras Clave:** Criptococosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, fluconazol, meningitis.

### Molecular typing and *in vitro* susceptibility to fluconazole of Costa Rican isolates of the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex

#### Abstract

**Introduction:** Cryptococcosis is a life-threatening fungal infection caused by the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. Our aim was to determine the molecular epidemiology and the antimicrobial susceptibility to fluconazole (FL) of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. **Methods:** Seventy-four patients with cryptococcosis were studied, from 2011 to 2014. Demographic data, risk factors and outcome of each patient were obtained from the medical records. The isolates were identified by standard methods, such as india ink preparation, urease test, growth on L-dopa and canavanine-glycine-bromothymol blue agar. The biochemical profile was identified by the automated system Vitek® (BioMérieux, France). The molecular types were assigned by RFLP-*URA5* analysis and the minimal inhibitory concentration (MIC) of FL was determined with the broth micro-dilution technique. **Results:** Cryptococcosis was more prevalent in HIV-positive male patients with a mean age of 43.5 years old. The majority of the isolates (93.6 %) were identified as *C. neoformans* var. *grubii* (93.2 % VNI and 5.4 % VNII) and 1.4 % as *Cryptococcus laurentii*. The MIC values of all isolates tested were  $\leq 8$   $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusion:** The most prevalent molecular type of the clinical *C. neoformans/C. gattii* species complex in Costa Rica is VNI. Additionally, FL was effective against the isolates tested.

**Key words:** Cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, fluconazole, meningitis.

#### Introducción

La criptococosis es una infección micótica oportunista causada por levaduras del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Mediante serotipaje y técnicas moleculares se ha logrado establecer que el complejo está conformado por cinco serotipos y nueve patrones moleculares<sup>(1)</sup>. La especie *C.*

*neoformans* está compuesta por: *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, patrones moleculares VNI, VNII y VNB; *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D, VNIV y por un híbrido AD, VNIII. Por otro lado, la especie *C. gattii* se divide en cuatro patrones moleculares VGI-VGIV y en los serotipos B y C. Esta patología presenta una distribución mundial; sin embargo, los distintos

agentes etiológicos, aislados a partir de muestras ambientales, clínicas humanas y veterinarias, tienen una distribución geográfica delimitada. Por ejemplo, el genotipo VNI posee distribución mundial; el VNB solamente se ha aislado en África, el VNIV prevalece en Europa, el VGI es principalmente aislado en Oceanía y la mayoría de los aislamientos del VGII provienen de América <sup>(1)</sup>, siendo este último el genotipo causante del brote de criptococosis en la isla de Vancouver, Canadá <sup>(2)</sup>.

Esta infección se desarrolla, por lo general, en pacientes VIH positivos en fase SIDA. Sin embargo, también se han reportado en portadores del virus de Hepatitis B, pacientes con enfermedades neoplásicas, diabetes mellitus descompensada, cirrosis hepática, enfermedades hematológicas <sup>(3)</sup> y según la Red de Vigilancia de Infecciones Asociadas a Trasplante en el 1 - 2 % de los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido <sup>(4)</sup>. Otros pacientes susceptibles son los que reciben terapia con corticosteroides <sup>(5)</sup>, quimioterapia citotóxica o inhibidores de la TNF- $\alpha$  <sup>(6)</sup>. Los genotipos VNI - VNIV y VGIII - VGIV son los responsables de causar meningoencefalitis en estos pacientes <sup>(7-9)</sup>. Por otro lado, entre un 17 y un 22 % de los casos de criptococosis se presentan en personas inmunocompetentes o que no presentan ningún factor de riesgo conocido <sup>(6)</sup> y son causados, en su mayoría, por los genotipos VGI y VGII <sup>(10,11)</sup>.

La infección por *Cryptococcus* se adquiere a través de la inhalación de levaduras, por lo que el cuadro comienza como una afección pulmonar. En pacientes inmunocompetentes, el hongo suele permanecer a este nivel formando granulomas (criptocomas); sin embargo, en inmunosupresos puede diseminarse hacia otros órganos, especialmente al sistema nervioso central <sup>(12)</sup>. La fungemia ha sido reportada en un 47 - 71 % de los pacientes VIH positivos en fase SIDA, pero solo en el 27 % de los pacientes que no han sido infectados por este virus <sup>(13)</sup>. Además, posee una alta mortalidad; por ejemplo, en los países desarrollados se reporta hasta un 30 % y en África es de más del 60 % <sup>(14,15)</sup>. Sin embargo, puede llegar hasta el 100 % en pacientes que no han recibido tratamiento antimicótico <sup>(14)</sup>.

El tratamiento de elección consiste en la administración de anfotericina B, 5-fluorocitosina y fluconazol (FL), pero las fallas terapéuticas y las recaídas son frecuentes <sup>(15)</sup>. Una de las posibles causas asociada a estas fallas terapéuticas es el uso extensivo de FL como tratamiento profiláctico contra la candidiasis, en los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La dosis recomendada para evitar una

infección por *Candida* spp. es de 200 mg por día, mientras que la recomendada contra *Cryptococcus* es de 400 mg por día, por lo que estas dosis menores favorecen la selección de cepas con sensibilidad disminuida <sup>(16)</sup>. Además, se ha demostrado que los pacientes infectados con cepas que presentan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) menores a 8  $\mu\text{g/mL}$  responden mejor al tratamiento que pacientes infectados con levaduras con CMIs mayores a 16  $\mu\text{g/mL}$  <sup>(17)</sup>. También, se ha observado que *C. gattii* VGII y otras especies como *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus humicola* presentan una resistencia mayor al tratamiento que los aislamientos de *C. neoformans* <sup>(18,19)</sup>. Por lo tanto, el presente estudio propone dar a conocer la variabilidad fenotípica y genética de algunos aislamientos clínicos costarricenses del complejo *C. neoformans/C. gattii* y su susceptibilidad *in vitro* al FL con el fin de aportar información que pueda contribuir a mejorar el tratamiento de la enfermedad.

## Métodos

### *Perfiles demográficos de los pacientes con criptococosis*

Se analizaron aislamientos de *Cryptococcus* obtenidos a partir de muestras clínicas de 74 pacientes con criptococosis provenientes de tres hospitales públicos del Área Metropolitana de la provincia de San José, capital de Costa Rica: Hospital México (HM), Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia (HCG) y Hospital San Juan de Dios (HSJD) (Figura 1), entre el 2011 y el 2014. Todos los datos obtenidos fueron analizados y presentados de forma tal que en todos los casos; sin excepción, se salvaguardó la identidad de cada paciente. Se obtuvo la siguiente información: i) sexo, edad y lugar de residencia del paciente, ii) condición al egreso, iii) factores de riesgo, iv) fecha del diagnóstico de la criptococosis, v) tipo de muestra de donde se aisló el cultivo, vi) anomalías radiológicas, vii) manifestaciones clínicas y viii) tratamiento. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Local de Bioética del Hospital San Juan de Dios, número de protocolo CLOBI-HSJD-21-2014.

### *Caracterización fenotípica de los aislamientos de Cryptococcus*

La identificación fenotípica se realizó con las siguientes pruebas: examen de la morfología microscópica con tinta china, producción de ureasa en agar urea de Christensen, producción de fenil oxidasas en agar L-Dopa, identificación con el sistema automatizado Vitek<sup>®</sup> (BioMérieux, Francia) e

inoculación en agar canavanina glicina azul de bromotimol (CGB)<sup>(20)</sup>.

**Figura 1.** Mapa de Costa Rica. Área de atracción de los hospitales México, Rafael Ángel Calderón Guardia y San Juan de Dios. Los tres hospitales pertenecen al tercer nivel de atención de la Caja Costarricense del Seguro Social de Costa Rica.



### Caracterización genotípica de los aislamientos de *Cryptococcus*

Se realizó una extracción de ADN genómico mediante la técnica de choque térmico<sup>(21)</sup>. La tipificación se realizó mediante la técnica de RFLP del gen *URA5*, con las enzimas Sau96I y HhaI, utilizando el protocolo de Escandón y colaboradores (2006)<sup>(7)</sup>. La amplificación se realizó con los imprimadores URA5 (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC 3') y SJ01 (5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3')<sup>(7)</sup>. Las condiciones de la mezcla para el PCR con un volumen final de 50 µL fueron: 50 ng de ADN, 1X de amortiguador de la DreamTaq (KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 20 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 mM de la mezcla de nucleótidos, 50 ng de cada imprimador y 1.5 U de la DreamTaq polimerasa (Thermo Scientific, Estados Unidos). Se llevó a cabo en 35 ciclos de amplificación: desnaturalización inicial 91 °C por 3 minutos, desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 62 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 2 minutos y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 minutos. 17 µL del producto de PCR fueron digeridos con las enzimas Sau96I (10 U/µL) y HhaI (20 U/µL). La restricción se realizó a 37 °C durante 3 horas. Las digestiones se corrieron en geles de agarosa al 2.5 % con buffer TAE a 80 V durante 3.5 horas. Los geles se tiñeron con GelRed (Biotium) y se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta<sup>(7)</sup>.

Como controles positivos se utilizaron las cepas de *Cryptococcus* WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNII), 629 (VNIV), WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 161 (VGIII) and WM 779 (VGIV), del

Westmead Institute for Medical Research, Sydney, Australia.

### Determinación de la susceptibilidad in vitro al fluconazol

Los patrones de susceptibilidad se determinaron mediante el método de microdilución en medio líquido según las directrices del documento M27-A3 del CLSI (del inglés *Clinical Laboratory Standard Institute*)<sup>(22)</sup>. Para ello, se preparó una solución madre de FL (Pfizer, Reino Unido) a 1280 µg/mL utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como diluyente. Las concentraciones finales del antifúngico en la placa fueron de 0.25 a 128 µg/ml. Los controles que se utilizaron fueron *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

### Análisis estadístico

Para analizar los resultados obtenidos se utilizó el programa SPSS para Windows, versión 19 (SPSS Inc., Chicago, Ill, EEUU). Se realizaron pruebas de  $\chi^2$  y t-student, con un 95 % de confianza, para determinar si existía asociación entre las variables demográficas y clínicas de los pacientes. Además, se determinó la media geométrica y el rango para las CMI<sub>50</sub> y la CMI<sub>90</sub>.

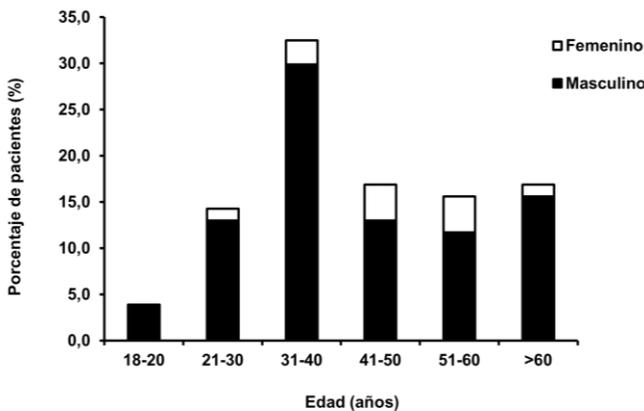
### Resultados

Se analizaron un total de 74 expedientes clínicos de pacientes con criptococosis. De estos, el 13.5 % eran de sexo femenino y el 86.5 % de sexo masculino. El promedio de edad fue de 43.5 años con un rango de 18 a 87 años. En la Figura 2 se muestra la distribución etaria de los pacientes. Es importante mencionar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de edad de los pacientes según sexo ( $t = 1.087$ ,  $gl = 72$ ,  $p = 0.281$ ). Con respecto al lugar de residencia, el 66.2 % de los pacientes provenían de la provincia de San José. No se encontró relación estadísticamente significativa entre esta variable y el estar infectado con VIH ( $X^2 = 8.477$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0.205$ ), sin embargo, el 39.3 % de los pacientes VIH positivos infectados con *Cryptococcus* provenían de los cantones de Desamparados y Central, de la provincia de San José (cantones pertenecientes al área de atracción del Hospital San Juan de Dios).

En la Tabla 1 se presentan los distintos factores de riesgo que presentaban los pacientes con criptococosis. El 75.7 % de los pacientes estaban infectados con VIH. Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la infección por este virus y el sexo del paciente ( $X^2$

= 7.995,  $gl = 1$ ,  $p = 0.011$ ) porque la proporción de hombres VIH positivos era mayor que la proporción de mujeres VIH positivas; la mayoría de las mujeres de este estudio habían sido sometidas a trasplante renal o tenían lupus eritematoso sistémico (LES). En promedio, el conteo de linfocitos CD4+ en los pacientes VIH/SIDA fue de 60.6 células/ $\mu$ L (rango de 2 a 396 células/ $\mu$ L), a la fecha del diagnóstico de la criptococosis y sus cargas virales de 4 108 a más de 1 000 000 copias/mL. Cabe resaltar que el médico tratante diagnosticó en fase SIDA al 58.9 % de los pacientes VIH positivos, luego de la infección con este hongo.

**Figura 2.** Distribución etaria de los pacientes diagnosticados con criptococosis en Costa Rica, según sexo.



El resto de los pacientes VIH positivos, ya habían sido diagnosticados en fase SIDA porque estaban infectados previamente con alguna(s) de las siguientes enfermedades: sífilis ( $n = 9$ ), tuberculosis ( $n = 7$ ), bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* ( $n = 1$ ), infección con *Neisseria* en líquido cefalorraquídeo (LCR) ( $n = 1$ ), pneumocistosis ( $n = 2$ ), candidiasis vaginal y oral ( $n = 4$ ), histoplasmosis ( $n = 1$ ), toxoplasmosis ( $n = 3$ ), tricomoniasis ( $n = 1$ ), infección con Virus Herpes ( $n = 3$ ), Citomegalovirus ( $n = 5$ ), Virus de Hepatitis B ( $n = 4$ ), Virus de Papiloma Humano en el recto ( $n = 1$ ) y estrongiloidiasis ( $n = 2$ ).

En la Figura 3 se muestra la distribución de las formas clínicas de criptococosis presentadas por los pacientes analizados. La principal presentación clínica de la enfermedad fue la meningitis. Se encontró que las manifestaciones clínicas sufridas por cada paciente eran dependientes de su enfermedad de fondo ( $X^2 = 12.013$ ,  $gl = 5$ ,  $p = 0.035$ ), ya que la proporción de pacientes VIH positivos con cuadros de meningitis (0.75) fue mayor que la de los pacientes VIH negativos (0.39). Además, los pacientes VIH positivos con meningitis fueron más

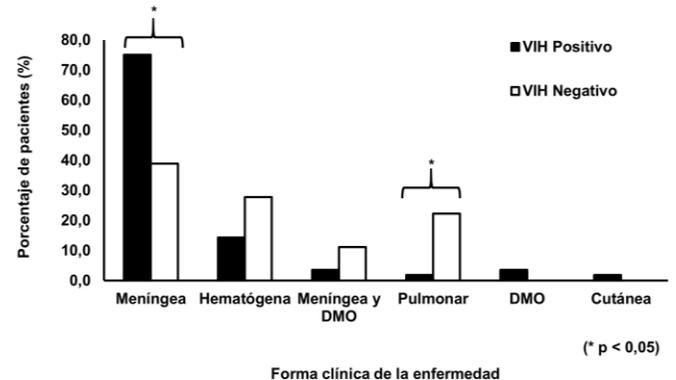
propensos a padecer de dolores de cabeza, náuseas, pérdida de peso y signos meníngeos de Kernig y Brudzinski. Por otro lado, la proporción de pacientes VIH negativos que desarrollaron complicaciones pulmonares (0.22) fue mayor que la de los pacientes VIH positivos (0.02).

**Tabla 1.** Factores de riesgo asociados a la infección con levaduras del género *Cryptococcus* ( $n = 74$ ).

Factor de riesgo	n	%
VIH	56	75.7
Uso de corticosteroides	12	16.2
Cáncer	11	14.9
Diabetes	11	14.9
Consumo de sustancias nocivas*	10	13.5
Trasplante Renal	5	6.8
Cirrosis	4	5.4
Enfermedades autoinmunes**	2	2.7
Mieloma múltiple	1	1.4
Sin factor de riesgo conocido	3	4.1

\*Drogas (cocaína, cannabis, benzodiacepinas), etilismo y tabaquismo.  
\*\*Colitis ulcerosa crónica inespecífica y lupus eritematoso sistémico.

**Figura 3.** Presentación clínica de la criptococosis de los pacientes VIH positivos y VIH negativos. DMO = Diseminación a médula ósea.



En la Tabla 2 se presentan los tipos de muestras clínicas de las cuales se aislaron las cepas de *Cryptococcus*. Los aislamientos fueron analizados tanto mediante pruebas bioquímicas como mediante pruebas moleculares. Según las pruebas fenotípicas, todos los aislamientos presentaron cápsula, hidrolizaron la urea y tenían lacasas. Sólo un aislamiento logró crecer en presencia de la canavanina y metabolizar la glicina; este aislamiento se obtuvo a partir de una biopsia de médula ósea y fue identificado por el equipo automatizado Vitek® como *Cryptococcus laurentii*, con un porcentaje de certeza del 95 %. El resto de los hongos fueron identificados como *C. neoformans*, al utilizar las técnicas bioquímicas.

El estudio molecular agrupó a los aislamientos identificados, por bioquímica, como *C. neoformans* en dos de los ocho patrones moleculares mayoritarios, 69 (93.24 %) eran del tipo molecular VNI y cuatro VNII (5.41 %) (Figura 4). Los pacientes VIH positivos estaban infectados con los genotipos VNI y VNII y con *C. laurentii*. Por otro lado, los pacientes VIH negativos sólo estaban infectados con levaduras del genotipo VNI.

**Tabla 2.** Tipos de muestras clínicas positivas por *Cryptococcus* spp. (n = 74).

Tipo de muestras	n	%
LCR	29	39.3
Hemocultivo	16	21.7
LCR y hemocultivo	14	19.0
LBA*	4	5.5
Líquido pleural	2	2.8
Médula ósea	1	1.3
Piel**	1	1.3
Hemocultivo y médula ósea	1	1.3
LCR y médula ósea	1	1.3
LCR y líquido ascítico	1	1.3
LCR, hemocultivo y LBA	1	1.3
LCR, hemocultivo y médula ósea	1	1.3
LCR, hemocultivo, médula ósea y biopsia de pulmón	1	1.3
LCR, hemocultivo, LBA y mucosas***	1	1.3

\*LBA = lavado broncoalveolar. \*\*úlceras nasal. \*\*\*úlceras rectal.

Todos los aislamientos analizados fueron clasificados como sensibles al fluconazol ya que presentaron CMI  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  (Tabla 3).

**Tabla 3.** Patrones de susceptibilidad *in vitro* al fluconazol de los aislamientos de *Cryptococcus* spp.

Especie y genotipo	n	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )			
		Rango	50	90	MG**
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI	69	0.25-8	0.25	4	1.74
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNII	4	1-4	2	4	2.75
<i>C. laurentii</i>	1	NA*	NA*	NA*	NA*
Total	74	0.25-8	0.25	4	1.77

\*NA = No aplica. \*\*MG = media geométrica.

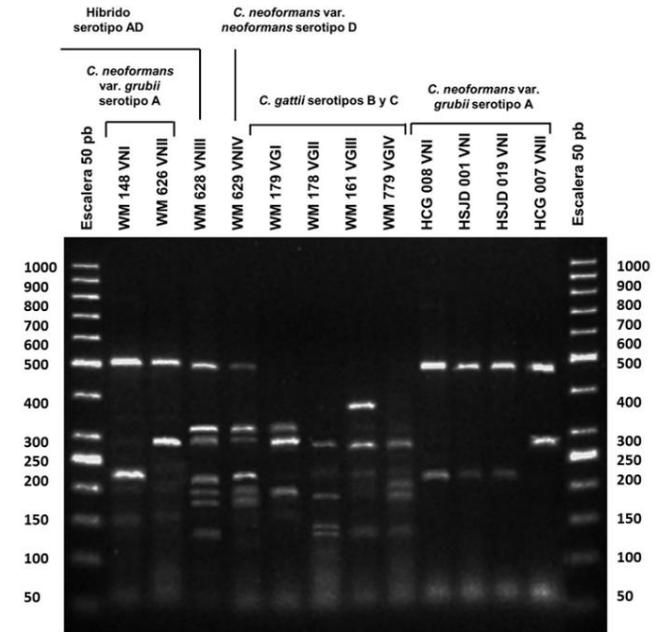
### Discusión

En el presente trabajo se determinaron los patrones moleculares del complejo *C. neoformans/C. gattii* y el patrón de susceptibilidad *in vitro* al FL de aislamientos clínicos costarricenses. Primeramente, se revisaron los expedientes clínicos para obtener información sobre la situación de esta enfermedad en la población estudiada.

Al analizar el perfil demográfico de los pacientes encontramos que la mayoría eran hombres, adultos y que

estaban infectados con VIH. Esto concuerda con la literatura mundial ya que la criptococosis es una infección oportunista y el número de casos aumentó exponencialmente a partir de la década de 1980, luego de la epidemia del SIDA (23-27).

**Figura 4.** Ejemplos de los genotipos del complejo *C. neoformans/C. gattii* detectados según la técnica de restricción enzimática del gen URA5. WM = Hospital Westmead; HCG = Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia; HSJD = Hospital San Juan de Dios; VG = variante *gattii*; VN = variante *neoformans*. Marcador de peso molecular (GeneRuler 50 pb DNA Ladder, Thermo Scientific®)



A su vez, la mayoría de los pacientes que estaban infectados con este virus vivían en los cantones Central y Desamparados de la provincia de San José. Esto es congruente con el informe del Ministerio de Salud de Costa Rica donde se menciona que para el 2014 los tres cantones con el mayor número de casos diagnosticados con VIH eran: Central de San José con 151 (45.6 casos por cada 100 000 habitantes), Central de Alajuela con 63 (21.8 casos por cada 100 000 habitantes) y Desamparados con 53 (23 casos por cada 100 000 habitantes) y los tres cantones con el mayor número de pacientes que entraron en fase SIDA eran: Central de San José con 24 (7.3 casos por cada 100 000 habitantes), Central de Heredia con 8 (6 casos por cada 100 000 habitantes) y Desamparados con 4 (1.7 por cada 100 000 habitantes) (28). Además, es importante destacar que, en Latinoamérica, entre el 55 y el 76 % de los pacientes VIH positivos son diagnosticados de forma tardía (29).

Nuestro país no es la excepción, ya que en un estudio realizado entre los años 2003 y 2009 que incluyó a 282

pacientes de la Clínica de Atención al Paciente con VIH del HSJD, se reportó que un 46.8 % de los pacientes fueron diagnosticados cuando ya presentaban conteos de linfocitos CD4+ menores de 200 células/ $\mu$ L. Esto indica que estos pacientes, según la evolución natural de la enfermedad, han sido portadores de la infección entre ocho y diez años, convirtiéndose en potenciales transmisores del virus, debido al desconocimiento y que están en riesgo de contraer distintas enfermedades oportunistas<sup>(30)</sup>, entre ellas la criptocosis. Por ejemplo, en este estudio a una paciente se le aisló *C. neoformans* partir de una úlcera que tenía en la nariz y luego del diagnóstico de la micosis se le realizaron exámenes para buscarle posibles causas de inmunosupresión, encontrándose que era VIH positivo en fase SIDA.

Existen dos teorías, complementarias entre sí, que tratan de explicar el por qué la mayoría de los casos de criptocosis son diagnosticados en pacientes masculinos. La primera se basa en que el principal factor de riesgo para contraer esta enfermedad es el estar infectado con VIH y la mayoría de los pacientes VIH positivos son de sexo masculino<sup>(31)</sup>. En Costa Rica; por ejemplo, la razón promedio de hombres a mujeres infectados con este virus es de 4.9 y de pacientes en fase SIDA de 4.8, entre los años 2011 y 2014<sup>(28)</sup>.

Por otro lado, en la época pre-SIDA, también se reportaba una mayor cantidad de pacientes masculinos con criptocosis; por lo tanto, la segunda teoría trata de explicar este fenómeno basándose en las diferencias que existen en la respuesta inmune de los pacientes masculinos y femeninos. McClelland y colaboradores analizaron el efecto de las hormonas sexuales sobre los factores de virulencia de *Cryptococcus* y encontraron que la testosterona induce la producción de cápsula, pero el 17- $\beta$ -estradiol no ejerce efecto sobre su producción<sup>(32)</sup>. Esto podría sugerir que los hombres se enferman tanto al inhalar levaduras que producen mucha cápsula como al inhalar levaduras que producen poca cápsula, porque su testosterona induce la producción de glucoroxilomanano (GXM), componente mayoritario de la misma. Por el contrario, las mujeres solo se enferman cuando inhalan levaduras que producen mucho GXM, porque cuando se infectan con hongos que producen cápsulas pequeñas, éstos son fácilmente opsonizados por las proteínas A y D del surfactante<sup>(33,34)</sup> y por el C3b<sup>(35)</sup>, facilitando así su fagocitosis.

Como se mencionó anteriormente, la criptocosis es una infección oportunista y por lo tanto, se manifiesta en pacientes que tengan alguna condición inmunosupresora. Los otros factores de riesgo encontrados en el estudio fueron uso de corticosteroides,

cáncer, diabetes mellitus, consumo de sustancias nocivas como cocaína y marihuana, cirrosis, mieloma múltiple, enfermedades autoinmunes y trasplantes de órgano sólido. Es importante resaltar que la criptocosis es la tercera micosis desarrollada por los receptores de trasplante de órgano sólido, manifestándose entre el 2 y el 8 % de estos pacientes<sup>(36)</sup>. Estas enfermedades de fondo concuerdan con las reportadas en otros estudios epidemiológicos<sup>(27,37,38)</sup> y con los reportes de casos clínicos de pacientes costarricenses a lo largo de la historia. El primer caso clínico confirmado de criptocosis en Costa Rica fue reportado en 1960 por Hidalgo y colaboradores. A partir de este momento se han publicado varios casos en los cuales se describen distintos factores de riesgo, a saber: etilismo, tabaquismo<sup>(39,40)</sup>, consumo de cocaína y marihuana<sup>(40,41)</sup>, diabetes mellitus, desnutrición<sup>(42)</sup>, uso de prednisona, LES<sup>(23,43)</sup> y por supuesto, VIH/SIDA<sup>(41,42)</sup>.

Por otro lado, el desarrollo de esta infección es poco frecuente en pacientes inmunocompetentes. En nuestro estudio tres (4 %) de los pacientes no presentaron ningún factor de riesgo conocido que favoreciera el desarrollo de la criptocosis. Estos pacientes estaban infectados con levaduras de los genotipos VNI. En otros países también se han reportado casos de pacientes inmunocompetentes enfermos. En Tailandia; por ejemplo, se reportó un porcentaje muy similar al encontrado en nuestro estudio (4.2 %)<sup>(27)</sup> y en Colombia de un 7.6 %<sup>(44)</sup>. El problema más grande es que la mortalidad suele ser mayor en estos pacientes, ya que cuando ingresan al centro médico no se sospecha que tengan una criptocosis y por ende, el diagnóstico se realiza de forma tardía. El diagnóstico e inicio de tratamiento tardío conllevan a la aparición de secuelas neurológicas, hidrocefalia y ceguera, afectando su calidad de vida<sup>(31)</sup>.

Con respecto a las distintas formas clínicas de la criptocosis, encontramos que los pacientes VIH/SIDA presentaban manifestaciones clínicas diferentes a las de los pacientes VIH negativos. Esto ha sido ampliamente documentado en la literatura mundial. La neurocriptocosis está principalmente descrita en personas VIH positivos<sup>(27,44)</sup>. Estos pacientes sufren de dolor de cabeza, fiebre, signos meníngeos de Kernig y Brudzinski, estado mental alterado, confusión, problemas neurológicos focalizados, aumento de la presión intracraneana y rigidez nuchal<sup>(25)</sup>. En estos pacientes con neurocriptocosis también se ha reportado diseminación a piel<sup>(44,45)</sup>. Las lesiones cutáneas pueden ser máculas, pápulas tipo molusco contagioso, pústulas, lesiones similares a Herpes Zóster, equimosis, púrpuras palpables, lesiones similares a

sarcoma de Kaposi, nódulos subcutáneos, úlceras tipo pioderma gangrenoso, gomas, abscesos, lesiones pseudo tumorales y celulitis<sup>(31)</sup>. En este estudio, una de las pacientes analizadas presentó lesiones cutáneas de tipo ulcerativo secundarias al foco primario pulmonar. En cambio, la presentación pulmonar es más frecuente en los pacientes VIH negativos<sup>(44)</sup>, lo cual fue observado también en el presente trabajo.

El análisis genético de los aislamientos obtenidos a partir de los pacientes con criptococosis reveló que el 98.5 % de los aislamientos se agruparon en dos de los genotipos mayoritarios del complejo *C. neoformans/C. gattii*. El principal genotipo determinado en este estudio fue el VNI. Diversos estudios epidemiológicos que se han llevado a cabo a nivel mundial también han reportado que el VNI es el principal causante de criptococosis<sup>(1,45,46)</sup>. Por ejemplo, en Suramérica se ha reportado en un 63 - 64 % de los aislamientos de pacientes adultos<sup>(46)</sup> y en el 85.3 % de los pacientes pediátricos<sup>(43)</sup>, en África en un 68 - 72.6 %<sup>(1,32,46)</sup> en Asia en un 74 - 81 %<sup>(1,45,46)</sup>. En el caso de Centroamérica, los estudios moleculares evidencian una prevalencia del VNI de 78 - 88 %; sin embargo, no se especifica si las muestras analizadas eran clínicas o ambientales<sup>(1,46)</sup>. El otro genotipo identificado fue el VNII. Este genotipo es menos frecuente ya que se ha reportado en un 0.2 - 13 % de los aislamientos<sup>(1,25,46)</sup>.

Por otro lado, uno de los pacientes estaba infectado con *C. laurentii*. Esto llama la atención porque las infecciones por levaduras que no pertenecen al complejo son muy poco frecuentes<sup>(31)</sup>. El caso del presente estudio corresponde a un paciente masculino de 34 años que en su historial clínico presentaba infección con VIH, baja adherencia a los antiretrovirales, drogadicción, pancitopenia, conteo de linfocitos CD4+ de 29 células/ $\mu$ L y una carga viral de 103 171 copias/mL. El paciente ingresó con un cuadro febril, confusión, mareos y baja respuesta a los estímulos y falleció cuatro días después de que se le aislara *C. laurentii* de médula ósea.

En el presente estudio, ninguno de los pacientes estaba infectado con *C. gattii*. Esta especie es la más frecuentemente aislada de pacientes australianos<sup>(1)</sup> y fue la responsable del brote de Vancouver, Canadá<sup>(10)</sup>. Sin embargo, los resultados obtenidos no descartan la presencia de esta levadura en nuestro país, ya que en un estudio previo en el que se analizaron 2 755 aislamientos recolectados globalmente, Meyer y Trilles identificaron una cepa de VGII proveniente de Costa Rica<sup>(46)</sup>, pero no se menciona si la cepa fue aislada a partir de una muestra clínica o ambiental.

Una vez identificadas las cepas, se procedió a determinarles el perfil de susceptibilidad *in vitro* al FL, ya que éste es el principal antifúngico empleado para el tratamiento de la criptococosis en Costa Rica. Como resultado principal, encontramos que todos los aislamientos analizados eran sensibles a este antimicótico y al igual que en un estudio publicado por Pedroso y colaboradores (2010)<sup>(48)</sup>. Esto es congruente con lo reportado por otros estudios, porque se estima que alrededor del 99 % de los aislamientos de *C. neoformans* a nivel mundial son sensibles<sup>(45)</sup>. La alta sensibilidad encontrada se podría deber a una baja presión selectiva, ya que la mayoría de los pacientes no recibieron tratamiento antimicótico profiláctico porque ingresaron al hospital cuando ya la criptococosis estaba muy avanzada.

A pesar de que la mayoría de los aislamientos, a nivel mundial, son sensibles, se considera que el amplio uso del fluconazol, especialmente en los pacientes VIH positivos, podría generar una presión selectiva en el surgimiento de cepas menos susceptibles a este tratamiento. En la literatura sí se han reportado casos de aislamientos del complejo *C. neoformans/C. gattii* resistentes a este antifúngico, pero son poco frecuentes y en su mayoría corresponden a la especie *C. gattii*<sup>(26)</sup>. El tratamiento para una criptococosis causada por *C. gattii* es el mismo que para una causada por *C. neoformans*, pero la respuesta es más lenta porque presentan MICs más altas y hay poca penetración del antimicótico en los criptococos<sup>(45)</sup>.

En conclusión, en el presente estudio se demostró por primera vez en Costa Rica el predominio de *C. neoformans* var. *grubii* VNI y que la resistencia no constituye un problema entre los aislamientos estudiados. Sin embargo, es fundamental realizar una vigilancia epidemiológica constante de los aislamientos autóctonos para así monitorear su comportamiento ante los antimicóticos y poder determinar de forma objetiva los lineamientos terapéuticos a seguir, con miras a mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por esta micosis.

### Agradecimientos

Le agradecemos al Dr. Wieland Meyer y a la Dra. Elizabeth Castañeda, por facilitarnos las cepas control del Complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. También a la Dra. Nury Mora Brenes del Hospital San Juan de Dios, a la Dra. Lilliana Sandoval del Hospital México y a las Dras. Cristina García y Yensie Robinson del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia, por todo su apoyo y por la donación de los aislamientos clínicos.

## Financiamiento

El proyecto fue financiado por los proyectos 803-B3-001 y 803-B6-119 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

## Referencias

1. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica 2013. 2013:1-23.
2. Kidd SE, Hagen F. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci 2004; 101:17258-63.
3. Tseng HK, Liu CP, Ho MW, Lu PL, Lo HJ, Lin H, et al. Microbiological, epidemiological, and clinical characteristics and outcomes of patients with cryptococcosis in Taiwan, 1997-2010. PLoS ONE 2013; 8(4): e61921. doi:10.1371/journal.pone.0061921.
4. Pappas PG. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. Trans Am Clin Climatol Association 2013; 124: 61-79.
5. Wilson TS, Fleming WA, Robinson FLJ, Nicholl B. Cryptococcal meningitis associated with steroid therapy. J Clin Path 1970; 23: 657-63.
6. Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with cryptococcosis according to immune status. PLoS ONE 2013; 8(3): e60431. doi:10.1371/journal.pone.0060431.
7. Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Castañeda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high diversity and the presence of the molecular type VGII mating type in Colombia. FEMS Yeast Res 2006; 6:625-35.
8. Desnos-Ollivier M, Patel S, Spaulding AR, Charlier C, Garcia-Hermoso D, Nielsen K, et al. Mixed infections and in vivo evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. mBio 2010; 1: 1-9. doi:10.1128/mBio.00091-16910.
9. Mijara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungro P, Umeyama T, Takazono T, et al. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. Med Mycol 2013; 51: 252-60.
10. Hoang LMN, Maguie JA, Doyle P, Murray F, Roscoe DL. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. J Med Microbiol 2004; 53: 935-40.
11. Chowdhary A, Prakash A, Randhawa HS, Kathuria S, Hagen F, Klaassen CH, et al. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. Mycoses 2013; 56: 222-8.
12. Rippon J. Micología Médica: Hongos y Actinomicetes Patógenos. 1 st ed. Medellín: Interamericana; 1990.
13. Antinori S. New insights into HIV/AIDS-associated cryptococcosis. Hindawi Pub Co. 2013: Article ID 471363.
14. Bicanic T, Harrison T. Cryptococcal meningitis. Br Med Bull 2005; 72: 99-118.
15. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS 2009; 23: 525-30.
16. Govender NP, Patel J, van Wyk M, Chiller TM, Lockhart SR, GERMS-SA. Trend in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(6): 2606-11.
17. Aller AL, Martin-Mazuelos E, Lozano F, Gomez-Mateos J, Steele-Moore L, Holloway WJ, et al. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1544-48.
18. Khan ZU, Randhawa HS, Chehadeh W, Chowdhary A, Kowshik T, Chandy R. *Cryptococcus neoformans* serotype A and *Cryptococcus gattii* serotype B isolates differ in their susceptibility to fluconazole and voriconazole. Int J Antimicrob Agents 2009; 33: 559-63.
19. Lockhart SR, Iqbal N, Bolden CB, DeBess C, De Bess E, Marsden-Haug N, et al. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 73: 144-8.
20. Gross N, Salas I. Métodos Diagnóstico en Micología Médica. 1st ed. San José: Editorial UCR; 2012.
21. Sosa MA, Rojas F, Mangiaterra M, Giusiano G. Prevalencia de especies de *Malassezia* asociadas a lesiones de dermatitis seborreica en pacientes de Argentina. Rev Iberoam Micol 2013; 30: 239-42.
22. Cantón E, Martín E, Espinel-Ingroff A. Capítulo 15 Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC, editores. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, 2007; ISBN:978-84-611-8776-8. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
23. Díaz JF, Alpízar R. 1994. Criptococcosis del sistema nervioso central en diez pacientes con lupus eritematosos sistémico. Rev Clin Esp 1994; 195: 12-5.
24. Arechavala AI, Ochiuzzi ME, Borgnia MD, Santiso GM. Fluconazole and amphotericin B susceptibility testing *Cryptococcus neoformans*: Results of minimal inhibitory concentrations against 265 isolates from HIV-positive patients before and after two or more months of antifungal therapy. Rev Iberoam Micol 2009; 26(3): 194-7.
25. Rothe C, Sloan DJ, Goodson P, Chikafa J, Mukaka M, Denis B, et al. A Prospective Longitudinal Study of the Clinical Outcomes from Cryptococcal Meningitis following Treatment Induction with 800 mg Oral Fluconazole in Blantyre, Malawi. PLoS ONE 2013; 8(6): e67311. doi:10.1371/journal.pone.0067311.
26. Ilnait- Zaragoza MT, Gerardus JF, Martínez GF, Breuker IC, Fernández-Andreu CM, Perurena-Lancha MR. Susceptibilidad in vitro frente a fluconazole y voriconazol de cepas de *Cryptococcus* aisladas en Cuba. Rev Cubana Med Trop 2009; 61(1): 70-4.
27. Chayakulkeeree M, Wangchinda P. Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Cryptococcal Meningoencephalitis in a Resource-Limited Setting. J Med Assoc Thai 2014; 97(3): 26-34.
28. Ministerio de Salud de Costa Rica. Costa Rica 2002-2014. Estadísticas de VIH, Sida y mortalidad por Sida. 2015. Tomado de [www.ministeriodesalud.go.cr](http://www.ministeriodesalud.go.cr)
29. Vidal JE, Penalva AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AISA-related

- cryptococcal meningitis in Latin America. *Braz J Infect Dis* 2013; 17(3): 353-62.
30. Vargas C, Boza R. Condición inmunológica de los pacientes portadores de VIH/SIDA en el momento de su diagnóstico en el Hospital San Juan de Dios. *Acta Med Costarric* 2012; 54(3): 159-64.
  31. Tello M, Gutiérrez E, Béjar V, Galarza C, Ramos W, Ortega-Loayza A. Criptococosis. *Rev Méd Risaralda* 2013; 19(2): 147-53.
  32. McClelland EE, Hobbs LM, Rivera J, Casadevall A, Potts WK, Smith JM, et al. The role of host gender in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infections. *PLoS ONE* 2013; 8(5):e63632.doi:10.1371/journal.pone.0063632.
  33. Ellerbroek P, Vecchiarelli A, Hoepelman A, Coenjaerts F. Chapter 17. Immunology of infections with *Cryptococcus neoformans*. In: Brown GD, Netea MG. *Immunology of Fungal Infections*. New York: Springer; 2007. p. 383-407.
  34. Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4(3): 252-7.
  35. Voelz K, May R. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot Cell* 2010; 9(6): 835-46.
  36. Khan A, El-Charabaty E, El-Sayegh S. Fungal infections in renal transplant patients. *J Clin Med Res* 2015; 7(6): 371-8.
  37. Trpković A, Pekmezović M, Barać A, Crnčević L, Arsić V. In vitro antifungal activities of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* isolates from cerebrospinal fluid and blood from patients in Serbia. *J Mycol Med* 2012; 22: 243-8.
  38. Zhong YH, Tan F, Li M, Liu J, Wang X, Yuan Y, Zhong XF, Peng FH. Comparisons of presentations and outcomes of cryptococcal meningitis between patients with and without hepatitis B virus infection. *Inter J Infect Dis* 2014; 20: 31-6.
  39. Alice E. Criptococosis. *Rev Med Costa Rica*. 1979; 46(467): 71-2.
  40. Campbell D. Meningitis por *Cryptococcus neoformans*, reporte de un caso. *Rev Col Microbiol Costa Rica*. 2007; 13(1): 16-7.
  41. Brizuela S, Montero N. Criptococosis asociado a VIH/SIDA (A propósito de un paciente). *Rev Med Costa Rica* 2013; 70(605): 43-7.
  42. Mora JF, Solano A, Rodríguez G, Artiñano M, Palma O, Chacón R, Sánchez T. Tratamiento con fluconazol de la candidiasis sistémica y la meningitis por *Cryptococcus*. *Rev Cost Cienc Med* 1989; 10(4): 61-9.
  43. Villalobos MA. Enfermedades infecciosas en pacientes con lupus eritematoso sistémico en el Hospital Calderón Guardia: Caracterización, incidencia, profilaxis y factores asociados. *Rev Clin Escuela Med UCR-HSJD* 2012; 22(4): 21-33.
  44. Escandón P, de Bedout C, Lizarazo J, Agudelo CI, Tobón A, Bello S, et al. Cryptococcosis in Colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomédica* 2012; 32: 386-98.
  45. Li M, Liao Y, Chen M, Pan W, Weng L. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. *Braz J Infect Dis* 2012; 16(2): 175-9.
  46. Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex. *Australian Biochemist* 2010; 41(1): 12-6.
  47. Lizarazo J, Escandón P, Agudelo CI, Castañeda E. Cryptococcosis in Colombian children and literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109(6): 797-804.
  48. Pedroso R, Lavrador M, Ferreira J, Candido R, Maffei C. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*- Pathogenicity of environmental isolates correlated to virulence factors, susceptibility to fluconazole and molecular profile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(8): 993-1000.
  49. Sloan D, Parris V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clin Epi* 2014; 6: 169-82.

**Autor Corresponsal:** Daniela Jaikel Viquez. Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica. Apartado postal: 905-3000, Heredia, Costa Rica. Teléfono (506) 8832-9008/ (506) 2511-8624. Email: [daniela.jaikelviquez@ucr.ac.cr](mailto:daniela.jaikelviquez@ucr.ac.cr)

**Conflict of interest:** No conflict of interest is declared.