

DIAGNÓSTICO DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* MEDIANTE LA PCR- RFLP EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) EN PACIENTES HOSPITALIZADOS EN EL SUR DE BRASIL

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS DIAGNOSIS USING PCR-RFLP ON CEREBROSPINAL FLUID (CSF) OF HOSPITALIZED PATIENTS IN SOUTHERN BRAZIL

Alexandre Lemos Souza¹, Rosiléia Marinho de Quadros¹, Rafael de Lima Miguel¹, Luiz Claudio Miletti²

RESUMEN

Introducción: *Cryptococcus neoformans* es un hongo levaduriforme encapsulado, de distribución mundial, principalmente en regiones tropicales, causando infecciones en individuos inmunocomprometidos, sobre todo en los infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). La capacidad de infección de este hongo es variable, pudiendo citar la facultativa patogenicidad, cápsula con actividad fagocitaria y producción de melanina como antioxidante. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de la PCR/ RFLP para la detección e identificación de *C. neoformans* directamente del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes ingresados en un hospital público de la ciudad de Lages, Estado de Santa Catarina, sur de Brasil, comparando el resultado con la tinción específica para el hongo y el crecimiento en medio de cultivo.

Métodos: Las muestras fueron directamente teñidas con tinta china para observar la cápsula, bien como después sembradas en medio de cultivo (agar dextrosa Sabouraud y agar de Níger) para crecimiento fúngico; también se hizo la extracción del ADN con fenol-cloroformo. La técnica fue utilizada para amplificación del gen URA5 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y después con las enzimas de restricción *HhaI* y *Sau96I* para genotipaje mediante la PCR-RFLP.

Resultados: En dos muestras fueron aislados *C. neoformans* con la tinción china y amplificados en la PCR, en las cuales fueron identificados como var. grubii.

Conclusión: El serotipo A var. grubii es lo más aislado en la criptococosis humana, principalmente en pacientes HIV, pero se desconoce la preferencia de este serotipo por este grupo de enfermos.

Palabras Clave: Hongo; levadura; criptococosis humana; LCR

ABSTRACT

Introduction: *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast with worldwide circulation, predominantly in tropical regions, causing infections in immunocompromised individuals, particularly those infected with human immunodeficiency virus (HIV). The virulence of this fungus is variable, and it should be mentioned the facultative pathogenicity, capsule with anti-phagocytic activity, and antioxidant melanin production. The aim of this study was to evaluate the use of polymerase chain reaction (PCR)/ restriction fragment length polymorphism (RFLP) for detection and identification of *C. neoformans* directly from the cerebrospinal fluid (CSF) of patients admitted to a public hospital with suspected meningitis and/or meningoencephalitis in the city of Lages, Santa Catarina, southern Brazil. Results were compared using Chinese ink and growth media.

[Clin Biomed Res. 2018;38\(2\):111-115](#)

1 Curso de Biomedicina, Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC). Lages, SC, Brasil.

2 Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Lages, SC, Brasil.

Autor correspondente:

Rosiléia Marinho de Quadros
biomedvety@gmail.com
Curso de Biomedicina, Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC)
Av. Castelo Branco, 190.
88509-900, Lages, SC, Brasil.

Methods: The samples were submitted to direct examination with Chinese ink for capsule observation, then to growth on culture media (Sabouraud Agar and Niger), with subsequent DNA extraction with phenol-chloroform. PCR was the technique used for amplification of URA5 gene, and then restriction enzymes *HhaI* and *Sau96I* were used for genotyping by PCR-RFLP.

Results: In two samples, *C. neoformans* were isolated by Chinese ink and amplified by PCR. They were identified as serotype var. *grubii*.

Conclusion: *C. neoformans* var. *grubii* is the most commonly isolated in human cryptococcosis, mainly in HIV patients. However, the preference of this serotype for this group of patients is unknown.

Keywords: Fungus; yeast; human cryptococcosis; CSF

Cryptococcus es un hongo levaduriforme encapsulado, de distribución mundial, encontrado principalmente en regiones tropicales, siendo responsable en gran parte de las infecciones neurológicas en personas inmunocomprometidas, sobre todo las infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)¹.

El género *Cryptococcus* presenta cerca de 70 especies descritas¹. Según la clasificación actual, existen dos especies principales que pueden causar enfermedades en el hombre: *C. neoformans* con los serotipos A, D y AD y la especie *Cryptococcus gattii* con los serotipos B y C. *C. neoformans* actualmente consiste en dos variedades: *C. neoformans* var *grubii* (serotipo A) y *C. neoformans* var *neoformans* (serotipo D)².

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* tienen amplia distribución geográfica, siendo encontrados en distintos nichos en áreas ambientales, pudiendo llevar a cabo enfermedades en los individuos inmunodeficientes e inmunocomprometidos, aumentando la morbilidad y la mortalidad en estos pacientes³. *C. gattii* presenta la enzima lacasa, que permite la colonización de la madera, encontrado inclusive en vegetales en descomposición. La especie fue aislada, principalmente, en árboles como eucaliptos (*Eucalyptus calmadulensis*), pero también ya fue aislada en otros vegetales como la cañandonga (*Cassia grandis*)⁴.

La criptococosis presenta, inicialmente, una infección en los pulmones, lo que sugiere la inhalación de estructuras del hongo por intermedio de partículas en las heces de palomas con tamaños y formas compatibles con la levadura encontrada en la deposición alveolar⁵. La levadura puede migrar a otras partes del cuerpo, principalmente al sistema nervioso central (SNC). El tropismo puede ocurrir por la cantidad de nutrientes encontrada en el líquido como timina, ácido glutámico, glutamina, carbohidratos y minerales, bien como también la localización puede ser debido a la poca o casi ausente respuesta de defensa del tejido cerebral⁶.

Bajo el punto de vista clínico, la criptococosis es confundida con otras enfermedades como gripes, constipación y neumonías, ya que las manifestaciones de los síntomas son fiebre, dolores de cabeza, vómitos, mareos y solamente cuando la infección está avanzada es que el paciente presenta quejas de rigidez en la nuca y dificultades de movilidad⁷.

Cerca de un millón de personas portadoras del virus HIV son infectadas por *C. neoformans* cada año y desarrollan meningitis criptocócica, con estimativas de más de 625.000 muertes anuales², mientras *C. gattii* ha sido observado en personas inmunocompetentes y brotes han sido descritos en Canadá y Estados Unidos¹. La muerte de personas infectadas con *C. gattii* puede ser resultado del atraso del diagnóstico cuando comparadas con los grupos de HIV y trasplantados infectados con *C. neoformans*, lo que enfatiza que uno factor crítico en el resultado de la enfermedad es mejorar el diagnóstico precoz. También es importante resaltar que en algunos casos la infección es heterogénea, con síntomas inespecíficos que influyen en el resultado del diagnóstico; sin embargo, subgrupos de casos que no tienen la enfermedad aparente pueden presentar, por consecuencia, la criptococosis diseminada⁸. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de la PCR/RFLP para la detección e identificación de *C. neoformans* directamente del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes ingresados en un hospital público de la ciudad de Lages, Estado de Santa Catarina, sur de Brasil, comparando el resultado con la tinción específica para el hongo y crecimiento en medio de cultivo.

MÉTODOS

Durante el período de julio a noviembre de 2014 fueron obtenidas 18 muestras de LCR, provenientes de pacientes ingresados con sospecha de meningitis y/o meningoencefalitis en un hospital público de la ciudad de Lages, Estado de Santa Catarina, sur de Brasil. Los pacientes tenían edades entre 24 a 39 años de ambos sexos.

Las muestras fueron analizadas primeramente por un examen directo mediante la tinción china para observar la cápsula de la levadura; en seguida, fueron sembradas en agar dextrosa Sabouraud (SDA) y agar de Níger para obtención del crecimiento de la levadura durante 10 días. Todas las muestras de líquido fueran congeladas a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para después extraer el DNA y hacer el genotipaje. El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Humana de la Universidade do Planalto Catarinense (UNIPALAC), protocolo número 057-13 de 2013.

La extracción del ADN genómico fue realizada mediante la técnica de fenol-cloroformo y tanto la cantidad de ADN como el grado de pureza fueron evaluados por espectrometría de acuerdo con la relación de absorbancia a 260/280 nm. Después de la cuantificación del material genético, las muestras fueron mantenidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para amplificación del fragmento genómico fue utilizado el gen URA5 de 750 pares de bases (pb), según descripción de Meyer et al.⁹.

Las reacciones fueran realizadas hasta el volumen final de 50 μL . Para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) fue preparada una mezcla conteniendo 3 μL de cloruro de magnesio, 1 unidad de Taq DNA polimerasa, 5 μL de tapón 10x, 2 μL de cada *primer* (CRYPTOF 5'-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCC-3' y CRYPTOR 5'-TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC-3'); 2 μL de DNTPs; 4 μL de DNA en concentración de 50 ng/ μL y 31 μL de agua mili Q estéril. La reacción ocurrió en un termociclador según las condiciones de denaturación inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min., seguido de 35 ciclos para denaturación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, anillado a $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un tiempo de 30 seg y extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, además de una extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% durante 90 min con miras a visualizar los resultados y fotodocumentarlos con la ayuda de un transiluminador.

El producto de la PCR fue sometido a la técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) también según Meyer⁹. Para la digestión enzimática fueran utilizadas dos endonucleasas de restricción (*Sau96I* y *HhaI*). Para eso fueran añadidos 4 μL de solución tampón CutSmart (New England Biolabs), 1 μL de la enzima *Sau96I* y 1 μL de la enzima *HhaI*. Las muestras fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante dos horas y después sometidas a la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Fueron utilizados diferentes serotipos de *C. neoformans* confrontando con las muestras. Para el control positivo fue utilizada la cepa 32064 de *C. neoformans* var *grubii* gentilmente cedida por el Centro de Biotecnología de la Universidade

Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ubicada en la ciudad de Porto Alegre, Estado de Rio Grande do Sul, sur de Brasil.

El producto de la PCR para las muestras positivas fue purificado y ligado al pGEM *Easy Vector* según las especificaciones del fabricante. La secuenciación (secuenciador automático ABI-PRISM 3100 *Genetic Analyzer* - Applied Biosystems) de las muestras fue realizado en la ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnología, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil).

RESULTADOS

El LCR de 18 muestras analizadas por el examen directo para identificar la cápsula del hongo con la tinción china, 11,11% (2/18) fueran positivas, pero las muestras no crecieran en el medio de cultivo con agar SDA tan poco en el agar de Níger.

Todas las muestras sometidas a la extracción de ADN, solo en las dos muestras positivas per la técnica de tinción que comparadas con el control positivo presentaron el mismo perfil de restricción para *C. neoformans* var. *grubii*, confirmando que estas pertenecen al mismo serotipo A (Figura 1). Las muestras eran de pacientes con VIH positivo del sexo masculino con edades de 24 años y 39 años.

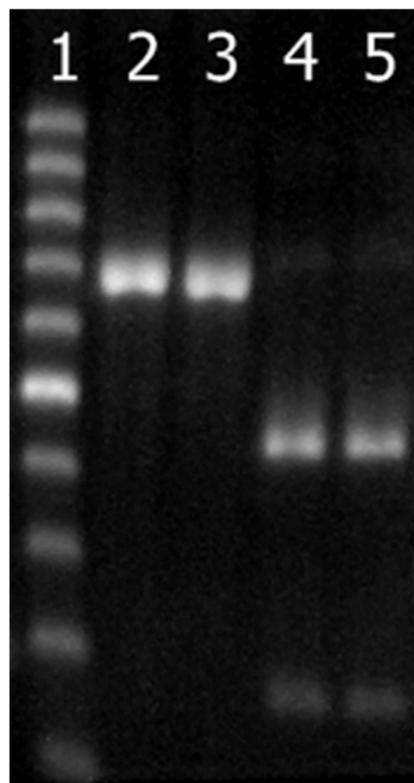


Figura 1: (1) Patrón 100pb; (2, 3) Amplificación de las dos muestras positivas; (4, 5) Serotipo A en las dos muestras positivas (RFLP).

DISCUSIÓN

Desde el primer caso descrito de la criptococosis en 1894, la investigación se ha incrementado debido, principalmente, a la pandemia mundial del SIDA, al uso generalizado de la quimioterapia y fármacos inmunosupresores; la incidencia criptocócica de las infecciones, especialmente meningoencefalitis, ha aumentado significativamente en las últimas décadas¹. En el transcurso de esta situación, se han empleado varios métodos para la identificación de levaduras, desde los métodos baratos y simples, tales como el examen directo con tinta china, aislamiento en cultivo, ensayos de aglutinación de látex con kits específicos hasta métodos moleculares tales como PCR, técnicas RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RAPD (*Random Amplified Polymorphic*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), PCR *fingerprinting* y secuenciación⁹. La elección de las técnicas de extracción de ADN de *C. neoformans* es variable y depende mucho de la fuente y preservación de las muestras¹⁰. La concentración de ADN obtenida a partir de las dos muestras fue positiva en concentraciones bajas, lo que puede ser explicado por el hecho de que las muestras no crecieron en Agar SDA tan poco en Agar Níger.

Los tratamientos para la infección fúngica pueden inhibir los componentes de la membrana como el ergosterol, producción de lacasa entre otros productos importantes para la composición del hongo, así pueden interferir también en la amplificación del fragmento genómico de muestras de LCR con *C. neoformans*. Pacientes debido recibir tratamiento con anfotericina B o fluconazol, como pacientes que están en el principio de la infección puede ser más difícil diagnosticar en el aislamiento y con coloración de la china la levadura, pues pueden presentar falsos negativos, lo que demuestra que no siempre la cantidad de levadura en el líquido cefalorraquídeo es suficiente para el diagnóstico de la enfermedad en la rutina¹¹. El diagnóstico molecular con la levadura en una concentración baja es un método de mayor sensibilidad, ya que la amplificación del gen puede ser identificada en la electroforesis^{9,12}.

La secuenciación de las dos muestras ha revelado que los pacientes con VIH estaban infectados con *C. neoformans* var. *grubii*. La variedad *grubii* serotipo A es la más común en Brasil, siendo aislada en fuentes ambientales y clínicas; los estudios muestran que el aislamiento de este serotipo es más común que otras especies como *C. gattii*, más observadas en los casos de contaminación ambiental¹³.

La patogenicidad del serotipo A todavía no es bien conocida y la falta de estudios revela diferencias entre

los diferentes grupos^{7,12}; también es difícil determinar si las diferencias en los resultados del tratamiento son debido a las variaciones de especies contra el impacto de la inmunidad del hospedero⁸.

Aunque no existan datos clínicos que sugieren cualquier tratamiento o resultados de las diferencias de *C. neoformans* var. *grubii* contra *C. neoformans* var. *neoformans*, se sugiere que es prudente que los laboratorios clínicos de referencia traten de correlacionar epidemiológicamente la distribución de las especies. A pesar de que la mayoría de las infecciones clínicas de todo el mundo es causada por *C. neoformans* var. *grubii*, la variedad *neoformans* ha sido más frecuente en ciertas ubicaciones geográficas, como India, Francia, Italia y Dinamarca y está asociada con infecciones en las personas más viejas como ancianos, la presencia de lesiones en la piel y el uso de corticosteroides¹⁴.

El serotipo A parece ocurrir más en pacientes con VIH y en edades comprendidas entre 20 y 40 años¹⁵, lo que corrobora con nuestro estudio donde los pacientes tenían 24 años y 39 años.

En lo que concierne a la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico, en el norte de Brasil se realizó un estudio para diagnosticar micosis invasivas con diferentes muestras biológicas (sangre, líquido cerebroespinal y médula ósea) a través del cultivo (agar sabouraud y mycosel) y por la técnica de PCR-RFLP simultáneamente. La sensibilidad fue del 100% en la detección de *C. neoformans* en el LCR y negativa en los métodos convencionales. El suceso para la PCR positiva puede ser debido a la presencia de células fúngicas muertas o al ADN residual de una infección anterior y por eso el no aislamiento en la cultura¹⁶.

Incluso con la dificultad con la extracción de ADN de la levadura, la biología molecular es una herramienta importante, especialmente en bajas concentraciones del material genético y en la ausencia del aislamiento, como se ha demostrado en este trabajo.

El método molecular puede permitir que el diagnóstico de *Cryptococcus* sea más rápido y más eficiente, excluyendo enfermedades con síntomas similares a la criptococosis. La variedad *grubii* encontrada en las muestras diagnosticadas está de acuerdo con la prevalencia en todo el mundo y en especial en pacientes con VIH, pero se desconoce la preferencia de este serotipo por este grupo de enfermos.

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Fang W, Fa Z, Liao W. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. *Fungal Genet Biol.* 2015;78:7-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.017>. PMID:25445309.
- Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol.* 2015;78:16-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>. PMID:25721988.
- Almeida RLG, Machado ER. *Cryptococcus* spp. em pacientes com HIV/SIDA: revisão da literatura. *Ensaio Cienc., Cienc. Biol. Agrar. Saúde.* 2014;18:55-63.
- Baltazar LM, Ribeiro MA. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(5):449-53. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000500003>. PMID:19009184.
- Queiroz JPAF, Sousa FDN, Lage RA, Izael MA, Santos AG. Criptococose: uma revisão bibliográfica. *Acta Vet Brasílica.* 2008;2:32-8.
- Gaona-Flores V. A central nervous system and *Cryptococcus neoformans*. *N Am J Med Sci.* 2013;5(8):492-3. <http://dx.doi.org/10.4103/1947-2714.117321>. PMID:24083226.
- Souza LKH, Costa CR, Fernandes OFL, Abrão FY, Silva TC, Tremea CM, et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(3):343-7. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0061-2012>. PMID:23856876.
- Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now. *Fungal Genet Biol.* 2015;78:49-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.003>. PMID:25312862.
- Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(2):189-95. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0902.020246>. PMID:12603989.
- Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. *Australian Biochemist.* 2010;41:11-5.
- Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull.* 2005;72(1):99-118. <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldh043>. PMID:15838017.
- Pedroso RS, Lavrador MAS, Ferreira JC, Candido RC, Maffei CML. *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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000800008>. PMID:21225196.
- Ribeiro MA, Ngamskulrungraj P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitória, ES, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50(6):315-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652008000600001>. PMID:19082371.
- McTaggart L, Richardson SE, Seah C, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 2011;49(7):2522-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00502-11>. PMID:21593254.
- Leal AK, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, Vainstein MH. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathol.* 2008;166(2):71-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-008-9123-2>. PMID:18443922.
- Sousa DRT, Santos CSS, Wanke B, Silva Júnior RM, Santos MC, Cruz KS, et al. PCR-RFLP as a useful tool for diagnosis of invasive mycoses in a health care facility in the North of Brazil. *Electron J Biotechnol.* 2015;2015(3):231-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.03.012>.

Recibido: 3 abr, 2018

Aceptado: 6 jun, 2018