

“Estudio Multicéntrico de Criptococosis en Argentina”

Departamento Micología, INEI – ANLIS “Dr. C.G.Malbrán”

Coordinadores: María Eugenia Bosco Borgeat, Graciela Davel

Participantes: Mariana Mazza, Constanza Taverna, Nicolás Refojo y laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Micología.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la frecuencia y distribución de las especies del complejo *Cryptococcus neoformans* asociado a infecciones humanas en la República Argentina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la frecuencia de criptococosis producida por *C. neoformans* y *C. gattii* en diferentes regiones de Argentina.
2. Identificar posibles grupos de riesgo distintos de pacientes con SIDA.
3. Estudiar los genotipos y tipos sexuales de *C. neoformans* y *C. gattii* con el fin de identificar las cepas circulantes asociadas a infección en humanos.
4. Conocer la distribución geográfica en el país de los genotipos circulantes y comparar los resultados con los descriptos en otras regiones.

ANTECEDENTES

La criptococosis es una enfermedad causada por las especies pertenecientes al complejo *Cryptococcus neoformans*, éste se encuentra formado por: *C. neoformans* (var. *neoformans* y var. *grubii*) y *C. gattii*.

Los métodos para la caracterización de las cepas del complejo *C. neoformans* utilizados mundialmente son fenotípicos como la serotipificación con sueros específicos (Ikeda 1982) y genotípicos como la PCR fingerprinting con primer M13 (Meyer 1999), la PCR - RFLP (Meyer 2003) y determinación de tipo apareamiento o tipo sexual.

Las cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* son serotipo D genotipo VN IV, las cepas de *C. neoformans* var. *grubii* son serotipo A y pueden ser genotipo VN I ó VN II, existe también cepas híbridas que pueden ser serotipo A, D o AD y genotipo VN III que surge de las combinaciones de VNI, VN II y VN IV.

Las cepas de *C. gattii* pueden ser serotipo B o C e, independientemente del mismo, pueden ser genotipo VG I, VG II, VG III y VG IV (Kwon-Chung 1992; Meyer 2003; Ikeda 1982).

La criptococosis producida por la especie *C. neoformans* es oportunista y cosmopolita. Se presenta más comúnmente como una meningoencefalitis asociada a pacientes con SIDA y con otros desordenes de la inmunidad, aunque, se han sido diagnosticados casos en pacientes inmunocompetentes. La criptococosis causada por *C. gattii* se encuentra más frecuentemente asociada a individuos inmunocompetentes.

El diagnóstico precoz puede mejorar el pronóstico, pero el principal problema es el sub-diagnóstico, principalmente en pacientes HIV negativos, donde el médico difícilmente sospecha esta micosis.

La criptococosis, como todas las micosis, no es de notificación obligatoria y por lo tanto no existen registros históricos que permitan estimar la prevalencia de esta micosis en la población de Argentina.

El hongo normalmente tiene su hábitat en el medio ambiente donde estaría principalmente asociado a la excreta de aves y material vegetal en descomposición. Comúnmente, la reproducción de esta levadura es de tipo asexual por medio de brotación. La infección se adquiere por vía inhalatoria, sin embargo, se encuentra en discusión la naturaleza de las partículas infectivas. Se postula que podrían ser aerosoles de levaduras disecadas o basidiosporas. Las basidiosporas son producidas tras la conjugación de células de tipo de apareamiento o "mating type" opuestos "α" y "a" (reproducción sexual). La reproducción sexual es heterotálica y para que ocurra dos cepas de un mismo serotipo y distinto "mating type" deben conjugarse. Este tipo de reproducción, de ocurrir en la naturaleza, posibilitaría la liberación de partículas infectivas en el ambiente y sería una importante fuente de variación genética.

Está demostrado que la virulencia del complejo *C. neoformans* depende de múltiples determinantes que pueden actuar o no en forma conjunta entre los que se incluye el tipo de apareamiento (Kwon-Chung 1992; Wickes 1996) y el genotipo.

El 98-99% de los aislamientos de *C. neoformans* ambientales y clínicos son mating type "α". Los aislamientos con mating type "a" descritos pertenecen a la var. *neoformans*. El "mating type "a" de la var. *grubii* se creía extinto, pero recientemente se detectó un grupo de cepas clínicas con estas características geográficamente restringidos a la región de Botswana (Litvinstseva 2005). Este descubrimiento ha estimulado la investigación de distintos grupos de trabajo para determinar la existencia y distribución global de aislamientos poco frecuentes con potencial para reproducción sexual. Además, nuevas cepas híbridas y cepas aneuploides han sido descritas (Bovers 2008, Xiaorong 2007). Aparentemente, existen diferencias regionales respecto a la distribución de los genotipos, cepas híbridas, serotipos y tipos sexuales.

Los antecedentes de distribución y frecuencia de aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii* en Argentina son escasos. En un trabajo realizado por el hospital Muñiz (Bava 1997) se describieron 253 casos de pacientes con criptococosis diagnosticados entre 1983 y 1993. El 92% se encontraba asociado a SIDA, del 8 % restante 4 casos fueron producidos por *C. gattii*.

En una encuesta realizada durante el año 2004 entre 72 laboratorios de la Red Nacional de laboratorios de Micología de Argentina (RNLM) (Davel 2007) se observó que la criptococosis ocupaba el segundo lugar en frecuencia con 328 casos, correspondiente al 20% de las micosis profundas diagnosticadas durante ese año.

Asimismo, son pocos los estudios realizados para determinar los genotipos circulantes en Argentina, y en ellos se han estudiado un escaso número de cepas.

En un estudio de aislamientos Iberoamericanos (Meyer 2003) fueron incluidas 53 aislamientos clínicos procedentes de Argentina. Entre los aislamientos identificados como *C. neoformans* 44 fueron genotipo VN I, 5 fueron VN II, 2 fueron híbridos VN III y no se encontró ningún VN IV. Sólo se estudiaron 2 aislamientos de *C. gattii* uno de los cuales fue VG II y el otro VG III. En otro estudio, realizado por el Departamento Micología – INEI (Refojo, 2009) se recuperaron 7 aislamientos de *C. neoformans* genotipo VN I y 5 aislamientos de *C.gattii* genotipo VG I provenientes de huesos de árboles de espacios verdes de la ciudad de Buenos Aires. También se recuperaron cepas de este tipo de muestras ambientales en ciudades de la cuenca del Río Paraná Mazza, 2008), donde se aislaron 2 cepas de *C. gattii* serotipo C y genotipo VG III en la ciudad de Resistencia y 2 cepas de esta misma especie serotipo B y genotipo VG I en las ciudades de Rosario y La Paz.

El presente proyecto permitirá determinar la frecuencia de las especies del complejo *Cryptococcus neoformans* y los genotipos involucrados en criptococosis humana en las diferentes regiones de Argentina.

La generación de una base de datos con las características genotípicas de las cepas circulantes en Argentina, permitirá comparar los resultados con los obtenidos en otros países para conocer la dinámica de dispersión de cepas.

METODOS

Duración del estudio: 2 años. Se incluirán las cepas aisladas entre 1 de abril del 2009 al 31 de marzo de 2011.

Aislamientos: Se incluirán todos los aislamientos clínicos que se recuperen en el período de duración del estudio independientemente de su origen (LCR, BAL, Piel, etc.). Se incluirá un aislamiento por espécimen clínico de cada paciente, y por cada episodio subsecuente si lo hubiera.

Actividades de los laboratorios de la RNLM participantes: Aislamiento de los especímenes. Identificación presuntiva de las cepas según la metodología que se realice de rutina en cada centro. Recolección de los datos clínicos mediante el llenado de la Ficha de Datos Clínicos. Derivación del aislamiento al Departamento Micología del INEI – ANLIS “Dr. C.G.Malbrán”.

Actividades del laboratorio de referencia: Identificación definitiva de los aislamientos. Confirmación a nivel de especie. Determinación de genotipo, mediante amplificación y comparación de perfiles de restricción del gen *URA5*, y determinación del tipo sexual mediante amplificación por PCR multiplex de genes *MAT* específicos de cada tipo.

Derivación de muestras: Las muestras aisladas por cada centro de salud participante serán enviadas al laboratorio de referencia según normas de bioseguridad vigentes. Cada centro recibirá el envase de transporte de material biológico para el envío de material clínico.

Confidencialidad del paciente: Este proyecto constituye un relevamiento de situación de las infecciones causadas por las especies del complejo *C. neoformans*. Los sitios participantes identificarán los pacientes con criptococosis para caracterizar la incidencia de estas infecciones, agentes etiológicos, la morbilidad y la mortalidad asociada.

A cada caso le será asignado un código de identificación del proyecto. Los datos clínicos y los especímenes de laboratorio enviados al centro de referencia no

contendrán información personal del paciente. Los datos serán analizados y guardados de forma que ninguna información que permita la identificación de los pacientes sea liberada.