



Artículo de investigación

Recuperación de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* ambientales y su asociación con aislados clínicos en Cúcuta, Colombia

Asbleide Angarita-Sánchez^{1*} Esp; Denny Cárdenas-Sierra¹ M.Sc; Claudia Parra-Giraldo² Ph.D; Claudia Diaz-Carvajal¹ M.Sc; Patricia Escandon-Hernandez³ M.Sc.

¹ Universidad de Santander, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo BIOGEN, Cúcuta, Colombia.

² Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Unidad de Proteómica y Micosis Humanas, Grupo Enfermedades Infecciosas, Bogotá, Colombia.

³ Instituto Nacional de Salud, Grupo de Microbiología, Bogotá, Colombia.

* Correspondencia: as.angarita@udes.edu.co.

Received: May 2018; Accepted: September 2018; Published: Marz 2019.

RESUMEN

Objetivo. Aislar, identificar y caracterizar molecularmente aislamientos de *Cryptococcus* patógenos para humanos a partir de muestras ambientales y clínicas de la ciudad de Cúcuta. **Materiales y métodos.** Se recolectaron 1300 muestras de 446 árboles de 10 especies diferentes, en 10 zonas públicas de Cúcuta. Concomitantemente, se obtuvieron aislados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (junio de 2016-junio de 2017). Se realizó cultivo en agar semillas de *Guizottia abyssinica*, posterior identificación bioquímica y caracterización genética mediante PCR-huella Digital y RFLP-URA5. **Resultados.** Se determinó prevalencia ambiental para *C. neoformans* de 4.3% (19 individuos positivos) y *C. gattii* de 0.2% (1 individuo positivo), para un total de 21 aislados y 20 árboles positivos. El parque Santander registró el 47.6% de la prevalencia global (10/21 aislados), seguido del parque La Victoria con 23.8% (5/21 aislados), correspondientes a *C. neoformans*. Se obtuvo un aislado de *C. gattii* en un individuo *Ficus benjamina* del parque Mercedes Ábrego. El análisis genotípico reveló presencia de *C. neoformans* var. *grubii* VNI en el 85.7% de los aislados ambientales, así como en el 100% de los clínicos, seguido de VNII y VGII en 9.5% y 4.8% de los aislados ambientales, respectivamente. **Conclusiones.** El muestreo longitudinal de los nichos ambientales previamente reportados del hongo revela su presencia y sugiere que se requiere una vigilancia permanente tanto en el medio ambiente como en los pacientes, especialmente en las zonas endémicas de la ciudad.

Palabras clave: Colombia, criptococosis, genotipo, hábitat, prevalencia (Fuentes: DeCS, MeSH).

ABSTRACT

Objective. Identify and molecularly characterize *Cryptococcus* isolates potentially pathogenic to humans from environmental and clinical samples collected in the city of Cúcuta. **Materials and methods.** We collected 1300 samples from 446 trees belonging to ten different species in ten public spaces in Cúcuta. We also obtained clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* collected between June 2016 and July 2017. Samples were cultivated in *Guizottia abyssinica* seed medium, and then were identified biochemically and characterized by fingerprinting PCR and RFLP of URA5 gene. **Results.** *C. neoformans* displayed an environmental prevalence of 4.3% (19 positive individuals) and *C. gattii* 0.2% (1 positive individual); this yields a total of 20 *Cryptococcus*-positive trees and 21 isolates. The Santander park registered 47.6% of the global prevalence (10/21 isolates), followed by La Victoria Park with 23.8% (5/21 isolates). One *C. gattii* isolate was collected from a *Ficus benjamina* tree located in Mercedes Ábrego park. Genotypic analysis revealed the presence of *C. neoformans* var. *grubii* VNI in 85.7% of environmental isolates as well as 100% of clinical isolates. VNII and VGII molecular types represented 9.5% and 4.8% of environmental isolates respectively. **Conclusions.** The longitudinal sampling of previously reported environmental niches of the fungus reveals its presence and suggests that a permanent surveillance in both environment and patients is required, especially in endemic zones of the city.

Keywords: Colombia, cryptococcosis, genotype, habitat, prevalence (Sources: DeCS, MeSH).

Como citar (Vancouver).

Angarita-Sánchez A, Cárdenas-Sierra D, Parra-Giraldo C, Diaz-Carvajal C, Escandon-Hernandez P. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* ambientales y su asociación con aislados clínicos en Cúcuta, Colombia. Rev MVZ Córdoba. 2019; 24(1):7137-7144. DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1601>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2019. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>), que permite el uso sin restricciones, la distribución y la reproducción en cualquier medio, siempre que se otorgue el crédito apropiado al autor o autores originales y la fuente.

INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una micosis que afecta a individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos, especialmente con SIDA (1,2,3,4,5,6). El agente causal de dicha micosis es la levadura encapsulada *Cryptococcus* spp, con sus dos especies patógenas *C. neoformans* y *C. gattii*. *C. neoformans* posee a su vez las variedades *grubii* (correspondiente al serotipo A, patrón molecular VNI y VNII) y la variedad *neoformans* (correspondiente al serotipo D, patrón VNIV), además del híbrido serotipo AD, patrón molecular VNIII. Por su parte, *C. gattii* comprende los serotipos B y C (patrón molecular VGI- y VGIV, respectivamente) (7). En 2015 se publicó una revisión de la taxonomía de ambos complejos con una nueva propuesta que incluía siete especies: *C. neoformans*, *C. deneoformans*, *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuteroagattii*, *C. tetragattii* y *C. decagattii* (8).

El estudio de aislados clínicos y ambientales de *Cryptococcus* como patógeno en humanos es relevante en la región de Cúcuta. La incidencia de la enfermedad en la población general en Colombia fue de 0.23 casos por cada 100.000 personas, siendo Norte de Santander el departamento con mayor incidencia: 0.56 casos por cada 100000 personas. *C. neoformans* var. *grubii* patrón molecular VNI se asocia como el principal agente etológico de la criptococosis tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Dada su alta morbi-mortalidad, la patología, a su vez se utiliza como un marcador centinela para monitorear infección por VIH (9). Análisis epidemiológicos y la constante ocurrencia de casos clínicos compatibles con criptococosis muestran a Cúcuta como una ciudad con alta prevalencia de la infección, principalmente aquella causada por *Cryptococcus gattii*, patrón molecular VGII (10).

Teniendo en cuenta la asociación del subgrupo genético VGII con alta virulencia y potencial para generar brotes, es importante mantener una vigilancia ambiental, que muestre las concentraciones, y apoyen posibles acciones de prevención (10). Aunque la infección por *C. gattii* es minoritaria en Colombia respecto a *C. neoformans* (serotipos A y D), el municipio de Cúcuta, tiene una alta prevalencia (60%) en pacientes VIH negativos (11) y a nivel global se reporta una menor frecuencia de criptococosis por *C. gattii* en pacientes inmunocomprometidos incluyendo VIH/SIDA, los cuales se han asociado a genotipos VGIII y VGIV, como es el caso de California, EUA, considerada zona endémica para VGIII atribuyéndosele infección en un 12% de éstos (12).

A partir del ambiente, el serotipo *C. gattii* fue aislado por primera vez en Cúcuta en el año 1998(13). Posteriormente, en el año 2011 se obtuvo el primer aislamiento ambiental de *C. gattii* serotipo B en esta misma ciudad (9).

Dada la alta incidencia de la criptococosis en la ciudad de Cúcuta, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *C. neoformans* y *C. gattii* en el área urbana de la ciudad y establecer la asociación de los aislamientos clínicos con aquellos recuperados de muestras ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y recolección de muestras. Se recolectaron 1300 muestras de 446 árboles distribuidas así: suelo (442), corteza (434), frutos secos (40) y hojas (384); en el momento de recolección de las muestras se seleccionaban como característica principal la presencia

heces de palomas en su superficie. El primer muestreo se realizó en el mes octubre de 2016 en los parques Mercedes Abrego, Simón Bolívar, Arcoiris (La Libertad) y zona periférica al Estadio General Santander. El segundo muestreo se llevó a cabo en el mes de enero del 2017 en los Parques Antonia Santos, La Victoria, Juana Rangel de Cuellar y Parque Santander y el tercero, en el mes de abril del 2017, se realizó en los Parques Nacional y Fuentes de Leones.

Por otra parte, se obtuvieron 6 aislados de *C. neoformans* de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes VIH positivos con criptococosis meníngea, procedentes del Hospital Universitario Erasmo Meoz de Cúcuta, entre los meses de junio de 2016 y junio del 2017. Estas muestras correspondieron al 4.3% de la totalidad de las reportadas a través de la vigilancia pasiva de la criptococosis que se realiza en el país mediante la Encuesta Epidemiológica sobre la Criptococosis en Colombia.

Procesamiento de muestras ambientales. Se realizó un mapeo de los lugares de muestreo donde se identificó a cada individuo (árbol) para la recolección de muestras en cada una de las zonas seleccionadas del área metropolitana de Cúcuta, empleando bolsas plásticas.

Estas fueron procesadas mediante la técnica de extracción de buffer fosfato salino (PBS), suplementando con antibiótico, como se describió previamente (14,15). En breve, 5g de muestra se resuspendieron en 25 ml de PBS 1X para homogenización y reposo durante 60 minutos. Posteriormente, se filtró cada homogenizado con gasa estéril, se adicionó el antibiótico y se dejó actuar por 60 minutos.

Un total de 100 µl de cada preparación fueron sembrados en agar semilla de guizottia para posterior incubación a 27°C durante 20 días, con observación periódica semanal, como ha sido referido (16).

Las colonias cremosas, elevadas, con bordes regulares y pigmento café (producción de melanina) obtenidas, fueron observadas al microscopio empleando tinta china (Figura 1). Toda colonia correspondiente a levaduras grandes, redondas y con presencia de cápsula fue sometida a pruebas de degradación de urea (17) y determinación de la especie empleando agar CGB (Agar canavanina glicina azul de bromotimol sódico) (18).



Figura 1. *Cryptococcus* spp. Agar semilla de guizottia (Producción de melanina). Universidad de Santander, Cúcuta.

Procesamiento de aislados clínicos. A los aislados de procedencia clínica (Figura 2) igualmente se les realizó cultivo en agar semilla de guizottia, pruebas de degradación de urea (14) y determinación de la especie en agar CGB (Canavanina glicina azul de bromotimol sódico) (18).

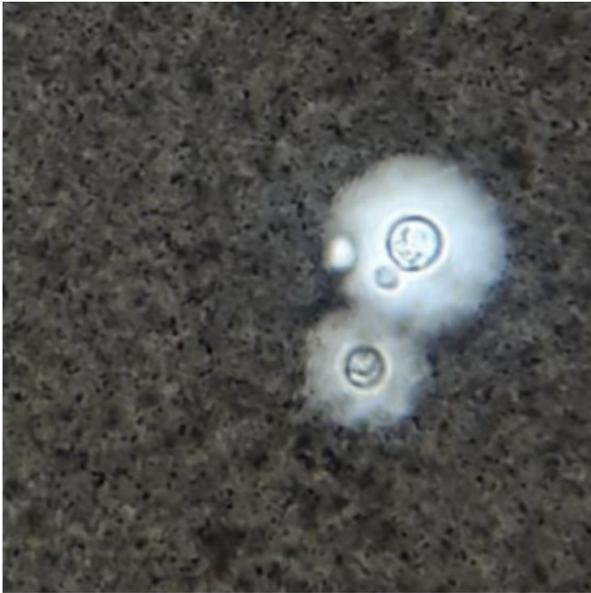


Figura 2. *Cryptococcus* sp muestra de líquido cefalorraquídeo en tinta china. Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud.

Determinación del patrón molecular por PCR–Huella digital. El ADN de alto peso molecular fue extraído, utilizando el método fenol: cloroformo:alcohol isoamílico según Casali et al (19). Este procedimiento se llevó a cabo utilizando biomasa obtenida de las cepas clínicas y ambientales una vez cultivadas en agar Saboureaud a 27°C por 48 horas. Posteriormente se transfirieron colonias del cultivo a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml y se incubaron a -20°C durante una noche. Después se suspendieron en 500µl de buffer de extracción (Tris - HCl 50 mM, EDTA 50 mM, dodecil sulfato sódico al 3%, 2 - mercaptoetanol 1%), agitando vigorosamente con vórtex y se incubaron a 65°C durante 1 hora. El lisado se extrajo con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 24: 1, vol/vol/vol). El ADN se recuperó mediante precipitación con isopropanol a -20°C durante una noche, se lavó con etanol al 70% (vol/vol) y finalmente, se resuspendió buffer TRIS - EDTA (TE). La concentración se midió mediante fluorescencia (Quibit 3.0 fluorómetro).

La caracterización molecular de las especies de *Cryptococcus* spp, se realizó mediante PCR - huella digital, utilizando como cebador único de secuencia específica microsatélite (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') descrito por Escandón y colaboradores en 2006 (20).

La mezcla de PCR de 50 µL contenía; 31.5 µL de agua desionizada estéril, 25 ng de ADN, 5 µl de tampón de PCR 10X (Tris / HCl 10 mM, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.02 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Promega, Madison, WI), acetato de sodio 3 mM (Sigma, Atlanta, GA), 0.8 ng de cebador (para GTG5 la concentración fue 10 ng), 2 mM MgCl, 1 ml de albúmina de suero bovino (BSA, 200 mg mL⁻¹ \Delta 1) y 0.05 U Amplitaq. La PCR se realizó durante 35

ciclos en un SimpliAmp™ Thermal Cycler utilizando, las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 50°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 20 segundos y un ciclo de extensión final a 72°C durante 6 minutos. Los productos de la amplificación, se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.4% en tampón Tris-borato EDTA (TBE) 1X a 100 V durante 2 horas.

Los productos de la amplificación GTG₅ se tiñeron con Gel red Nucleid Acid Gel Stain Biotium a 0.3 mg mL⁻¹, durante 30 minutos. Las bandas se visualizaron bajo luz UV utilizando marcador de tamaño molecular de 1 kb en tres pozos para permitir la normalización de los gels. Los tipos moleculares (VNI-VNIV y VGI-VGIV) se asignaron para comparar las cepas de referencia de los ocho tipos moleculares principales cargados en cada gel (21).

Determinación del patrón molecular por RFLP- gen URAS y análisis de asociación. La identificación de los tipos moleculares de *Cryptococcus* spp., se realizó tanto a las cepas clínicas como ambientales con los dos cebadores URAS 5 (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG3') y SJ01 (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC3'). La reacción de la PCR se llevó a cabo según lo descrito por Meyer et al (17); los productos de la PCR se sometieron a una doble digestión enzimática con *Sau 96I* y *Hha I* a 37°C durante 3 horas. Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3% en tampón Tris-borato EDTA (TBE) 1X a 100 V durante 5 horas. Los perfiles de restricción fueron comparados con los patrones obtenidos de las cepas de referencia, utilizando análisis en módulo BioGalaxy del programa Biolomics, versión 3.0.

RESULTADOS

Caracterización de muestras ambientales. El 75% de los árboles analizados provenían de 6 parques: parque Simón Bolívar en primer lugar con 80 individuos, seguido de los parques Santander, La Victoria, Nacional, Mercedes Ábrego (con 70, 68, 67 y 50 individuos, respectivamente), siendo esta última cantidad igual para la zona circundante al Estadio General Santander.

A su vez, la diversidad de los individuos analizados en el presente trabajo comprendió 10 especies, siendo el Oití (*Licania tomentosa*) la más ampliamente distribuida y predominante con el 66.4% del total de individuos, seguida del Almendro (*Terminalia catappa*) con 13.2%, abarcando estas dos especies aproximadamente el 80 % de la muestra total. El 20% restante se distribuyó entre Mamoncillo (*Melicoccus bijugatus*) 7.2%, Ficus (*Ficus benjamina*) 5.4%, Tamarindo (*Tamarindus indica*) con 2.9%, Chiminango y Totumo (*Pithecellobium dulce*) 1.8% cada uno, Samán (*Samanea saman*), Limón swingle (*Swinglea glutinosa*) y Mango (*Mangifera indica*), 0.4% cada uno.

El cultivo inicial reveló la presencia de 21 aislados compatibles con *Cryptococcus* sp, 20 de los cuales correspondían a *C. neoformans* (95.2%) y 1 a *C. gattii* (4.8%), obtenidos a partir de 20 de los 446 individuos, ya que en un mismo árbol se obtuvo doble positividad para *C. neoformans* (Tabla 1). Por lo anterior, se obtuvieron prevalencias de 4.3% y 0.2%, para *C. neoformans* y *C. gattii*, respectivamente.

Tabla 1. Descripción de muestras positivas para *C. neoformans* y *C. gattii*

Identificación de muestra	Tipo de muestra	Zona de procedencia	Especie del individuo	Especie de <i>Cryptococcus</i>	Variiedad	Genotipo <i>Cryptococcus</i>
25	Corteza	Parque Santander	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
35	Corteza	Parque Santander	Oití (<i>Licania tomentosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
37	Tierra	Parque Santander	Oití (<i>Licania tomentosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
39a*	Hojas	Parque Santander	Oití (<i>Licania tomentosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
39b*	Tierra	Parque Santander	Oití (<i>Licania tomentosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
47	Corteza	Parque Santander	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
58	Tierra	Parque Santander	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
63	Corteza	Parque Santander	Samán (<i>Samanea saman</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
68	Corteza	Parque Santander	Oití (<i>Licania tomentosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
69	Tierra	Parque Santander	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
1	Corteza	Parque La Victoria	Totumo (<i>Crescentia cujete</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
10	Tierra	Parque La Victoria	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN II
44	Corteza	Parque La Victoria	Chimnango (<i>Pithecellobium dulce</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN II
45	Corteza	Parque La Victoria	Limón swingle (<i>Swinglea glutinosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
49	Corteza	Parque La Victoria	Mamoncillo (<i>Melicoccus bijugatus</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
2	Tierra	Parque Mercedes Ábrego	Ficus (<i>Ficus benjamina</i>)	<i>C. gattii</i>	<i>gattii</i>	VG II
5	Corteza	Fuente de Leones	Oití (<i>Licania tomentosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
7	Tierra	Parque Antonia Santos	Oití (<i>Licania tomentosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
12	Corteza	Parque Arcoiris-La Libertad	Almendro (<i>Terminalia catappa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
32	Tierra	Estadio General Santander	Oití (<i>Licania tomentosa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I
58	Corteza	Parque Simón Bolívar	Almendro (<i>Terminalia catappa</i>)	<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	VN I

*Muestras derivadas del mismo individuo

Aislados ambientales con su zona de procedencia, especie del individuo y aislamiento con su tipo molecular identificado por PCR- huella digital con cebador (GTG) 5 y por RFLP gen URA5.

En total, el parque Santander ocupó el primer lugar en prevalencia con 47.6% de los 21 aislados obtenidos, seguido del parque La Victoria (23.8%) y finalmente los parques Fuente de Leones, Antonia Santos, Arcoiris (La Libertad), Simón Bolívar y alrededores del Estadio General Santander (cada uno con 4.8% de los aislados), exclusivamente para *C. neoformans* var *grubii*, ya que un único aislado de *C. gattii* se obtuvo en el parque Mercedes Ábrego (4.8% de los aislados).

A su vez, el cálculo de la prevalencia por cada zona pública estudiada reveló datos sobresalientes especialmente para dos de éstas: parque Santander con 12.8% (9/70 individuos fueron positivos) y parque La Victoria con 7.3% (5/68 individuos fueron positivos), en ambos casos sólo para *C. neoformans*. Se muestra la prevalencia individual para las distintas zonas evaluadas (Figura 3).



Figura 3. Prevalencia para *Cryptococcus* sp en áreas públicas de Cúcuta.

El análisis de positividad según tipo de muestra evidenció un predominio de aislados de *C. neoformans* obtenidos a partir de corteza y suelo con el 60% (12/20 aislados) y 35% (7/20 aislados), respectivamente, mientras que sólo uno fue obtenido a partir de hojas (5%). Lo anterior implica una prevalencia general para *C. neoformans* a partir de corteza, suelo y hojas, de 3.0% (de 434 muestras), 1.6% (de 442 muestras) y 0.3% (de 384 muestras), respectivamente.

Respecto a *C. gattii*, se obtuvo única positividad en una muestra de suelo (Tabla 1). En general, no se obtuvieron aislados a partir de las 40 muestras de frutos secos analizados en el presente estudio.

La presencia de *C. neoformans* VNI se concentró en un 55.5% en el parque Santander (10/18 aislados), seguido de un 16.6% en parque la Victoria (3/18 aislados) y una minoría se distribuyó en los parques Fuente de Leones, Antonia Santos, Arcoiris (La Libertad), Simón Bolívar y alrededores del Estadio General Santander, con 5.3% de los aislados para cada zona (1/18 aislados), mientras que el tipo molecular VNII se halló exclusivamente en el parque la Victoria, aislado a partir de suelo y corteza de las especies arbóreas Mango (*Mangifera indica*) y Chimnango (*Pithecellobium dulce*), respectivamente.

Por otra parte, el aislado de *C. gattii* correspondió a VGII, siendo a su vez el único obtenido a partir del parque Mercedes Abrego, a partir de suelo asociado a un individuo de Ficus (*Ficus benjamina*) (Tabla 1).

Caracterización de muestras clínicas. El análisis genotípico a partir de muestras clínicas reveló la presencia de *C. neoformans* en todos los casos, correspondientes en su totalidad al tipo molecular VNI (Figura 4).

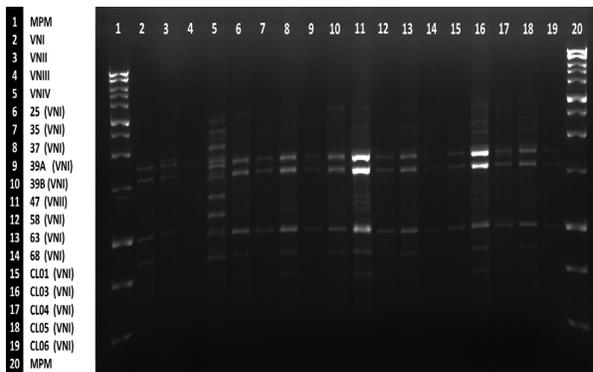


Figura 4. PCR huella digital de aislados clínicos y ambientales de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* usando el cebador (GTG), con marcador de peso molecular 1kb y cepas de control.

Relación genética entre los aislados de *C. neoformans* de procedencia clínica y ambiental.

La PCR huella digital y el RFLP del gen *URA5*, reveló que el patrón genético encontrado en esos aislamientos de pacientes también está presente en la mayoría de los aislamientos ambientales. Se observó una correlación entre estos dos tipos de aislamientos a nivel genético /parque Santander (10/18 aislamientos), seguido por 16.6% en Parque la Victoria (3/18 aislamientos), y una minoría se distribuyó entre la Fuente de Leones, Antonia Los parques Santos, Arcoiris (La Libertad) y Simón Bolívar y los alrededores del Estadio General Santander, con el 5.3% de los aislamientos para cada zona (1/18 aislamientos); el tipo molecular VNII se encontró exclusivamente en Victoria Park en el suelo y la corteza de los árboles Mango (*Mangifera indica*) y Chiminango (*Pithecellobium dulce*), respectivamente.

Por el contrario, el aislamiento de *C. gattii* correspondió a VGII, siendo a su vez el único obtenido de Mercedes Abrego Park de un *Ficus* individual (*Ficus benjamina*) (Tabla 1).

DISCUSIÓN

En el contexto ecológico se ha referido predominio de *C. neoformans*, especialmente *C. neoformans* var. *grubii* VNI y VNII (serotipo A), cuyo hábitat se extiende también a excretas de aves (22). Estos dos tipos moleculares son igualmente los más prevalentes en casos de criptococosis (97%) en individuos inmunosuprimidos en Colombia (21,22,23) y otros países incluso europeos (24). Sin embargo, la presencia ambiental de *C. gattii* reviste especial relevancia en torno a su capacidad de generar enfermedad en individuos inmunocompetentes y su potencial de adaptación a distintas condiciones geográficas, dejando de ser exclusivo de zonas tropicales y subtropicales, para pasar a hallarse también en zonas templadas y lluviosas (25).

El presente trabajo abarcó 10 zonas públicas altamente concurridas de la ciudad de Cúcuta, en las cuales en su mayoría se reveló la presencia de patógenos del género *Cryptococcus* sp, exceptuando los parques Nacional y Juana Rangel de Cuéllar. La prevalencia hallada fue consistente con lo referido previamente

(22), mayor en general para *C. neoformans* (4.3%) respecto a *C. gattii* (0.2%) a razón de 21.5:1, pero por otra parte, contrastante con datos previos reportados para la ciudad de Cúcuta en particular (años 2008 y 2009), habiéndose referido como de 0.07% de manera similar para ambas especies del hongo, incluso con un tamizaje significativamente mayor de individuos (3634) procedentes de zonas La Libertad, San Eduardo y alrededores del Estadio General Santander (26).

Según nuestros hallazgos, la positividad para *C. neoformans* mostró predominio en el parque Santander (47.6% de los 21 aislados), seguido del parque La Victoria (23.8%) y finalmente los parques Fuente de Leones, Antonia Santos, Arcoiris (La Libertad), Simón Bolívar y alrededores del Estadio General Santander (cada uno con 4.8% de los aislados), exclusivamente para *C. neoformans* variedad *grubii*. Tomando en cuenta lo anterior, podemos concluir que los parques Santander (especialmente y con prevalencia individual superior al 10%) y La Victoria, constituyen nichos ecológicos relevantes para *C. neoformans*, aportando éste último además variabilidad genética al hallarse tanto el tipo molecular VNI como el VNII (única zona con hallazgo de éste último).

Se contó con una variedad de especies arbóreas que evidenciaron ser nichos del hongo, especialmente Oití (*Licania tomentosa*), ampliamente distribuida en las zonas evaluadas, a partir de la cual se identificó el 38% del total de aislados (8/21 aislados), todos correspondientes a *C. neoformans* VNI, además de hallarse en diversidad de fuentes (corteza, tierra y hojas), seguida del Mango (*Mangifera indica*), a partir del cual se obtuvieron 4 aislados (19%), tanto en tierra como en corteza, correspondientes a *C. neoformans* variedad *grubii* (VNI y VNII) y el Almendro (*Terminalia catappa*), con dos aislados (9.5%), identificados como *C. neoformans* VNI, en contraste con el reporte previo de éste último como hábitat tanto de *C. neoformans* como de *C. gattii* (25).

En el parque Santander de manera interesante, los cinco aislados obtenidos de la especie arbórea oití (*Licania tomentosa*) correspondieron a cuatro individuos, puesto que uno de ellos fue doble positivo, revelando la presencia de *C. neoformans* VNI simultáneamente en suelo o tierra adyacente al mismo y en sus hojas.

Este caso único de doble positividad para *Cryptococcus neoformans*, registrado en el presente trabajo no tiene antecedente en la ciudad, en lo que respecta al tipo de árbol (*Licania tomentosa*).

Según lo publicado por Firacative et al (26), el rastreo de más de 4300 muestras procedentes de árboles de diversas zonas de Cúcuta y áreas cercanas a la vivienda de pacientes infectados por *C. gattii* serotipo B (VGI/a), arrojó sólo un aislamiento de éste patógeno, dos aislamientos de *C. gattii* serotipo C (VGIII/a) y tres de *C. neoformans* serotipo A (VNI/a), donde uno de éstos últimos, junto con el único aislado de *C. gattii* (VGI/a) se obtuvieron de un mismo árbol pero en ese caso de especie *Ficus* (*Ficus benjamina*) en el sector San Eduardo.

De igual manera, en los alrededores del Estadio General Santander, también en suelo de un mismo árbol *Ficus*

(*Ficus benjamina*) se hallaron simultáneamente *C. gattii* (VGIII/a) y *C. neoformans* serotipo A (VNI/a) (26).

Con relación a lo anterior, el presente trabajo reveló positividad para ésta última especie de árbol, pero correspondiente al aislamiento de *C. gattii* VGII a partir de muestra de tierra en el parque Mercedes Ábrego (sin antecedente), en plena zona céntrica de la ciudad de Cúcuta. ésta fue la cuarta zona con mayor cantidad de individuos tamizados, sin embargo, sólo uno de sus 50 árboles resultó positivo, tratándose de un individuo *Ficus* (*Ficus benjamina*).

Ficus benjamina alberga tanto a *C. gattii* como a *C. neoformans* (26), se reviste de importancia si se considera la presencia de los genotipos VGI, VGII y VGIII tanto en muestras ambientales como en pacientes con enfermedad criptocócica (10,21,23). Estos tres tipos moleculares también han sido asociados a casos de criptococosis humana y animal en el occidente de Estados Unidos. Particularmente los genotipos VGII y VGIII de origen ambiental se han identificado como el posible agente etiológico de la micosis en individuos VIH positivo (27).

Los hallazgos en la zona circundante al Estadio General Santander son consistentes con un reporte previo, el cual mostró la presencia de *C. neoformans* (26), permitiendo concluir sobre su persistencia en el área. Sin embargo, esta positividad se observó por primera vez en árboles de la especie *Licania tomentosa*, reflejando una variación tanto de los tipos de hábitat del hongo, como de las especies del patógeno que circulan en una zona determinada.

Dada la amplia distribución ambiental de *C. neoformans* y *C. gattii*, y su asociación a patología en individuos inmunosuprimidos e incluso inmunocompetentes, resulta relevante el rastreo permanente de zonas comunes de alta confluencia poblacional (25).

En concordancia con lo anterior, el reconocimiento de la identidad entre aislados de *Cryptococcus* sp de procedencia clínica respecto a la ambiental, mediante la comparación de genotipos circulantes es de gran interés teniendo en cuenta además el aumento de los casos de criptococosis en individuos VIH positivos, al comparar los lapsos de tiempo 1997-2005 con el periodo 2006-2010 (3000 casos/millón de habitantes y 3300 casos/millón de habitantes, respectivamente) (21,23). A lo anterior se suma que la incidencia de criptococosis afecta también a menores de edad en Colombia (menores de 16 años), donde la infección por VIH constituye un factor de riesgo reconocible en apenas la mitad de los casos, quedando por factores de riesgo concomitantes. Resulta preocupante, sin embargo, que esta incidencia es siete

veces mayor para el mismo grupo poblacional en Norte de Santander (0.122 casos/100.000 habitantes), respecto a la media nacional (0.017 casos/100.000 habitantes) (28).

El análisis genotípico de las especies patógenas procedentes de 6 muestras clínicas en el presente trabajo reveló exclusivamente la presencia de *C. neoformans* var *grubii* VNI (100% de los casos). en consistencia con el amplio predominio registrado para éste en estudios como el de González et al en México (29), durante 12 años, a partir de 166 muestras clínicas (no se especifica si expresamente de pacientes VIH+), quienes refirieron prevalencia para *C. neoformans* de 92.2%, respecto a *C. gattii* (7.8%) y correspondientes a VNI (74.6%), VNII (9%), VNIII (4.8%), VNIV (3.6%), VGI (3.6%), VGII (1.8%), VGIII y VGIV (1.2% cada uno) (29).

Es necesario ampliar el número de aislamientos clínicos que permitan determinar asociaciones con los aislamientos ambientales del patrón VNII, así como *C. gattii* presente en el ambiente.

Es de resaltar que Cúcuta se caracteriza por sectores ampliamente arborizados y la presencia de gran cantidad de aves destacándose principalmente la Paloma de la especie *Columbia livia* en los parques estudiados, siendo más representativa la presencia de estas en el Parque Santander en donde este trabajo permite confirmar el nicho de la levadura, otros estudios también evidencian la relación existente entre los nichos ecológicos y estas aves (30); de ahí la importancia de una vigilancia epidemiológica debido a la cercanía con los humanos y el hecho de que pueden trasladarse de un parque al otro.

Estos datos relacionados con la alta prevalencia de pacientes con diagnóstico de criptococosis y su relación genética con los aislados ambientales es de gran aporte en los programas de salud pública.

Conflictos de interés

Los autores informan no tener ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

Al Grupo de Microbiología Instituto Nacional de Salud, a la Unidad de Investigación en Proteómica y Vicerrectoría de investigación Proyecto ID 8247 y a la Universidad de Santander, financiación de proyecto número PFCF0215385771745EJ. A los auxiliares de investigación estudiantes del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico Universidad de Santander campus Cúcuta: Erika Y Guerrero Martínez Kelly, J Carrascal Quintero, Eliana J Moreno Mora, Damarys L Gelvez Trujillo, Aymet P Rubio Cano, Gyovany A Rincón Castrillón.

REFERENCIAS

1. Ye F, Xie J-x, Zeng Q-s, Chen G-q, Zhong S-q, Zhong N-s. Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis. *Lung*. 2012; 190(3):339-346. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00408-011-9362-8> PMID:22246551
2. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol*. 2006; 60:69-105. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102> PMID:16704346
3. Perfect JR. Management of cryptococcosis: how are we doing? *PLoS med*. 2007; 4(2):e47. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040047> PMID:17284156
4. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(3):291-322. DOI: <https://doi.org/10.1086/649858> PMID:20047480
5. Alvarez-Moreno CA, Cortes JA, Denning DW. Burden of Fungal Infections in Colombia. *J Fungi*. 2018; 4(2):41. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof4020041> PMID:29561795 PMCid:PMC6023354
6. Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113(7):1-15. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180057> PMID:29668825
7. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang ZA, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4(7):a019760. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019760> PMID:24985132
8. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009> PMID:25721988
9. Escandón P, Lizarazo J, Agudelo CI, Casta-eda E. Cryptococcosis in Colombia: Compilation and Analysis of Data from Laboratory-Based Surveillance. *J Fungi*. 2018; 4(1):32. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof4010032> PMID:29494502
10. Lizarazo J, Escandón P, Agudelo CI, Firacative C, Meyer W, Casta-eda E. Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997–2011. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(11):e3272. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003272> PMID:25411779
11. Lizarazo J, Chaves O, Pe-a Y, Escandón P, Agudelo CI, Casta-eda E. Comparación de los hallazgos clínicos y de supervivencia entre pacientes VIH positivos y VIH negativos con criptococosis meníngea en un hospital de tercer nivel. *Acta Med Colomb*. 2012; 37(2):49-61.
12. Chen SC-A, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27(4):980-1024. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00126-13> PMID:25278580
13. Callejas A, Ordóñez N, Rodríguez M, Castaneda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol*. 1998; 36(5):341-344. DOI: <https://doi.org/10.1080/02681219880000531> PMID:10075505
14. Paliwal D, Randhawa H. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*. 1978; 7(4):346-348. PMID:357441
15. Escandón P, Quintero E, Granados D, Huérfano S, Ruiz A, Casta-eda E. Isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B from detritus of Eucalyptus trees in Colombia. *Biomédica*. 2005; 25(3):390-397. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i3.1363> PMID:16276686
16. Staib F, Seibold M, Antweiler E, Fröhlich B. Staib Agar Supplemented with a Triple Antibiotic Combination for the Detection of *Cryptococcus neoformans* in Clinical Specimens: Staib-Agar mit einer Dreifach-Antibiotika-Kombination für den Nachweis von *Cryptococcus neoformans* in klinischem Untersuchungsmaterial. *Mycoses*. 1989; 32(9):448-454. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1989.tb02280.x> PMID:2691887
17. Kwon-Chung K, Wickes BL, Booth J, Vishniac HS, Bennett JE. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 1987; 55(8):1751-1754. PMID:3112009
18. Min K, Kwon-Chung K. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1986; 261(4):471-480. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0176-6724\(86\)80079-7](https://doi.org/10.1016/S0176-6724(86)80079-7)
19. Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro ÂM, Amaral AA, Alves SH, et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res*. 2003; 3(4):405-415. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00038-2)

20. Escandón P, Sánchez A, Martínez M, Meyer W, Casta-eda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(4):625-635. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00055.x> PMID:16696659
21. Escandón P, de Bedout C, Lizarazo J, Agudelo CI, Tobón Á, Bello S, et al. Cryptococcosis in Colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomédica.* 2012; 32(3):386-398. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.707> PMID:23715187
22. Chowdhary A, Randhawa HS, Prakash A, Meis JF. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. *Crit Rev Microbiol.* 2012; 38(1):1-16. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.606426> PMID:22133016
23. Lizarazo J, Linares M, de Bedout C, Restrepo Á, Agudelo CI, Casta-eda E. Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica.* 2007; 27(1):94-109. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.236> PMID:17546227
24. Cogliati M, Zamfirova RR, Tortorano AM, Viviani MA, Network FC. Molecular epidemiology of Italian clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates. *Sabouraudia.* 2013; 51(5):499-506. DOI: <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.751642> PMID:23286351
25. Mak S, Vélez N, Casta-eda E, Escandón P. The fungus among us: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* ecological modeling for Colombia. *Journal of Fungi.* 2015; 1(3):332-344. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof1030332> PMID:29376914 PMCID:PMC5753128
26. Firacative C, Torres G, Rodríguez MC, Escandón P. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. *Biomedica.* 2011; 31(1):118-123. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i1.342> PMID:22159490
27. Springer DJ, Billmyre RB, Filler EE, Voelz K, Pursall R, Mieczkowski PA, et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. *PLoS Pathog.* 2014; 10(8):1-19. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004285> PMID:25144534
28. Lizarazo J, Escandón P, Agudelo CI, Casta-eda E. Cryptococcosis in Colombian children and literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(6):797-804. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-0276130537> PMID:25317708
29. González GM, Casillas-Vega N, Garza-González E, Hernández-Bello R, Rivera G, Rodríguez JA, et al. Molecular typing of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex from Northeast Mexico. *Folia Microbiol.* 2016; 61(1):51-56. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0409-8> PMID:26109075
30. Montagna MT, De Donno A, Caggiano G, Serio F, De Giglio O, Bagordo F, et al. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from environmental sources and genetic comparison with clinical isolates in Apulia, Italy. *Environ Res.* 2018; 160:347-352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.032> PMID:29054089