CORRELACIÓN MOLECULAR POR TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST) DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE C*ryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* EN SEIS DEPARTAMENTOS DE COLOMBIA

Norida Natally Vélez Cuellar

Universidad El Bosque

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Maestría en Epidemiología

Bogotá

2015

Trabajo de investigación

CORRELACIÓN MOLECULAR POR TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST) DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE C*ryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* EN SEIS DEPARTAMENTOS DE COLOMBIA

Dirigido por:

Patricia Escandón

Grupo de Microbiología

Instituto Nacional de Salud

Presentado por

Norida Natally Vélez Cuellar

Trabajo de grado para optar el título de Magister en Epidemiología

Universidad El Bosque

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Maestría en Epidemiología

Bogotá

2015

APROBACION

“La Universidad El Bosque no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento Administrativo de Ciencia tecnología e Innovacion-Colciencias, por su aporte económico como beneficiaria de financiación dentro del proyecto código 2011-3600115683.

Al grupo Colombiano para el estudio de la criptococosis, por su continuo esfuerzo y aporte científico.

Al Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, por su aporte técnico y económico.

A mis compañeros de Microbiología.

DEDICATORIA

Agradezco a todas las personas que me acompañaron en este tiempo, escucharon y aconsejaron, a mi Madre, hermanos, familia y amigos. Estaré infinitamente agradecida con todo el Grupo de Microbiología por contribuir día a día con mi trayectoria profesional, en especial con la Doctora Patricia por su constante acompañamiento, apoyo y formación.

No puedo cambiar la dirección del viento, pero si ajustar mis velas para llegar siempre a mi destino.

James Dean

Tabla de Contenido

1. Introducción 13

2. Justificación 17

3. Marco de referencia 19

3.1 Historia 19

3.2 Agente Etiológico 20

3.3 Criptococosis 21

3.4 Factores de virulencia 24

3.5 Modelo invertebrado "*Galleria mellonella*" 26

3.6 Diversidad genética 27

3.7 Epidemiología y Ecología 28

3.8 Brote por *C. gattii* en Vancouver, Canadá 30

3.9 Modelo de Nicho Ecológico 30

3.10 Criptococosis en Colombia 32

4. Propósito de Investigación 37

4.1 Pregunta de Investigación 37

5. Objetivos 38

5.1Objetivo General 38

5.2 Objetivos Específicos 38

6. Materiales y métodos 39

6.1 Diseño del estudio..... 39

6.2 Material biológico..... 39

6.3 Aéreas de estudio 39

6.4 Objetivo específico Nº1. 40

6.5 Objetivo específico Nº2. 44

6.6 Objetivo específico Nº3 46

6.7 Objetivo específico Nº4 53

7. Resultados y Discusión 58

7.1 Objetivo específico Nº1. 58

7.2 Objetivo específico Nº2. 61

7.3 Objetivo específico Nº3 69

7.4 Objetivo específico Nº4 79

8. Conclusiones 87

9. Referencias Bibliográficas 89

10. Anexos 113

Lista de figuras

Figura 1: *Escala de medición de la enzima fenoloxidasa.*…… 50

Figura 2: *Caracterización de aislamientos clínicos y ambientales de Cryptococcus neoformans y Cryptococcus gattii por PCR huella digital GTG_5 (A) y RFLP del gen URA5 (B).*…… 59

Figura 3. *Análisis filogenético de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans* …… 64

Figura 4. *Análisis filogenético de aislamientos clínicos y ambientales de C. gattii* ……..... 65

Figura 5. *Coloración con tinta china de ST93 clínico (A) y ST93 ambiental (B) de C. neoformans (40X)*.. 70

Figura 6. *Fenotipo de colonias presente en todos los aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii* …… 71

Figura 7. *Pareja sexual a ó α presente en algunos de los aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii.*…….. 72

Figura 8. *Actividad enzimática de: A: Fosfolipasa, B:proteasas y C:Fenoloxidasa de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii.*…… 73

Figura 9. *Curva de supervivencia de las larvas de Galleria mellonella de secuencias tipo de aislamientos clínicos y ambientales de A: C. neoformans y B: C. gattii.*…… 78

Figura 10. *Predicción de nicho ecológico para C. neoformans basado en datos clínicos* …… 84

Figura 11. *Predicción de nicho ecológico para C. neoformans basados en datos ambientales.*…… 85

Figura 12. *Predicción de nicho ecológico para C. gattii.*…… 86

Lista de tablas

Tabla 1: *Descripción de áreas de estudio según sus características físicas y condiciones macro-ecológicas.*…… 40

Tabla 2: *Condiciones de amplificación, PCR huella digital con el iniciador* $(GTG)_5$..... 42

Tabla 3: *Condiciones de amplificación, Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen URA5*……. 43

Tabla 4: *Nomenclatura y peso molecular de genes consenso amplificados con el esquema de MLST.*…… 44

Tabla 5: *Condiciones de reactivos* y concentraciones *utilizados para la estandarización de los siete genes multi-locus* …….. 45

Tabla 6. *Condiciones de amplificación PCR pareja sexual "alfa" y "a".*…… 49

Tabla 7: *Patrón molecular de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii 2005-2014.*..... 58

Tabla 8: *Manifestaciones clínicas, factores de riesgo y condición de egreso de casos de Criptococosis.*…… 62

Tabla 9. *Aislamientos ambientales de C. neoformans y C. gattii por genero de árbol y material biológico.*…... 62

Tabla 10 *Secuencias tipo de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii* ….… 63

Tabla 11 *Características de la creación de los tres modelos de nicho ecológico para C. neoformans y C. gattii en Colombia.*…… 83

Resumen

La incidencia anual promedio de la criptococosis en Colombia es de 2,4 casos x10^6 habitantes, en pacientes con SIDA es de 3,3 casos x10^3; los serotipos A y B son los más prevalentes; se ha reportado la presencia del hongo en el ambiente identificando los serotipos A, B y C en diferentes regiones del país. Como la criptococosis es adquirida presuntivamente por la inhalación de propágulos fúngicos presentes en el ambiente, es de gran importancia el estudio epidemiológico de esta enfermedad.

Se tipificaron un total de 1063 aislamientos clínicos y ambientales mediante PCR huella digital y Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción, se identificaron cinco patrones moleculares entre el periodo 2005-2014, el patrón molecular VNI fue el más prevalente en aislamientos clínicos y ambientales; se genotipifico por MLST 110 aislamientos clínicos (n=61) y ambientales (n=49) se identificaron 21 secuencias tipos (ST), para *C. neoformans* se identificaron 13 ST entre las cepas de VNI y un ST para VNII; para *C. gattii* se identificaron tres ST para VGII y dos ST para VGI-VGIII respectivamente.

Se realizaron tres mapas de predicción de nicho ecológico: dos de *C. neoformans* y uno de *C. gattii*, para la creación del modelo se emplearon casos humanos y lugares positivos de muestreos ambientales, combinando capas de datos ambientales influyentes para la presencia del hongo.

Este estudio permitió conocer la distribución geográfica de los diferentes serotipos y patrones moleculares, se amplió el conocimiento acerca de la epidemiología, ecología y etiología de este patógeno en Colombia. Se demostró la importancia de combinar datos de casos clínicos, ambientales y datos moleculares para el estudio de la criptococosis, este enfoque fue esencial para identificar las asociaciones entre tipos de cepas.

Palabras clave: *Cryptococcus neoformans, Cryptococus gattii*, molecular, , MLST, correlacion.

Abstract

The average annual incidence of cryptococcosis in Colombia is 2.4 X 106 inhabitants, in AIDS patients is 3.3 cases x103; serotypes A and B are the most prevalent; has reported the presence of the fungus in the environment by identifying the serotypes A, B and C in different regions. As cryptococcosis is presumptively acquired by inhaling fungal propagules present in the environment, it is very important epidemiological study of the disease.

A total of 1063 clinical and environmental isolates were typed by PCR fingerprint and Fragment Length Polymorphism Restriction five molecular patterns between 2005-2014 were identified, the molecular pattern NIV was the most prevalent in clinical and environmental isolates; MLST was genotyped for 110 clinical isolates (n = 61) and environmental (n = 49) 21 sequence types (ST) were identified for C. neoformans 13 ST were identified among strains of NIV and ST for VNII; for C. gattii three ST for VgII and two ST for VGI-VGIII respectively they were identified. Three maps niche prediction were performed: two of C. neoformans and C. gattii one to model creation human cases and positive local environmental sampling, combining layers influential environmental data for the fungus were used.

This study allowed to know the geographical distribution of the different serotypes and molecular patterns, knowledge about the epidemiology, ecology and etiology of this pathogen in Colombia expanded. the importance of combining data from clinical, environmental and molecular data for the study of cryptococcosis cases was demonstrated this approach was essential to identify associations between types of strains.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, molecular, MLST, correlation.

1. Introducción

La criptococosis es una micosis oportunista, adquirida por la inhalación de propágulos fúngicos de tamaño microscópico presentes en el ambiente; es una infección potencialmente fatal que afecta los pulmones y el sistema nervioso central (1-3), afecta tanto a personas inmunosuprimidas, como inmunocompetentes (4). La criptococosis es causada por dos especies a saber: *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotipo A), var. *neoformans* (serotipo D), un híbrido correspondiente al serotipo AD y *Cryptococcus gattii* (serotipos B y C) (5,6). Estas especies presentan diferencias fenotípicas, genotípicas y epidemiológicas, así como en su distribución geográfica (7).

C. neoformans var. *grubii* y var. *neoformans* son de distribución mundial y afectan preferencialmente a individuos inmunocomprometidos como aquellos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (2-4). Los excrementos de aves, particularmente de palomas (*Columba livia*), y suelos contaminados con éstos, han sido informados como fuentes saprofíticas de *C. neoformans* var. *grubii* y var. *neoformans* (8). La incidencia de la criptococosis oportunista causada por la var. *grubii* ha crecido en los últimos años a nivel mundial, debido a su ocurrencia en individuos VIH positivos (3-5).

C. gattii, se describió por primera vez en el ambiente en 1990, cuando investigadores australianos señalaron los detritos de algunas especies de *Eucalyptus* como nichos de esta especie (9). A partir de esa fecha *C. gattii* ha sido aislado de la naturaleza asociado con detritos, flores, oquedades y madera en descomposición de diferentes árboles, entre ellos los *Eucalyptus, Acacias, Ficus* y *Terminalia catappa*, en varias regiones del mundo (10-13). Se encuentra principalmente en regiones tropicales y subtropicales, afectando a individuos inmunocompetentes (6,14-16), aunque

en los últimos años se ha descritoen regiones templadas como Canadá, California y Oregón (16-19).

En 1999, en la isla de Vancouver en Columbia Británica, Canadá, se describió el primer brote de criptococosis registrado en la historia. A partir de esa fecha, se han reportado en la isla un gran número de casos de criptococosis, todos debidos a *C. gattii*, serotipo B. El brote ha producido más de 236 casos confirmados, con 19 muertes y una incidencia de criptococosis en la isla de 37 casos/millón de habitantes/año, para el período 2002-2005, la más alta informada mundialmente (17). Aunque en los últimos años la incidencia promedio anual de *C. gattii*, ha aumentado en diferentes partes del mundo como en EEUU (8,3 casos/millón de habitantes/año), Australia (10,4 casos/millón de habitantes/año), Brasil (1,93 casos/millón de habitantes/año), India (24 casos/millón de habitantes/año) y Sur América (4 casos/millón de habitantes/año) (20-25).

Un estudio realizado en Columbia Británica empleó un modelo de nicho ecológico, basándose en los datos ambientales y la vigilancia de los casos clínicos, para predecir las áreas geográficas que tienen las condiciones ecológicas adecuadas para mantener la colonización permanente de *C. gattii* en la Columbia Británica, definiendo sitios como óptimos, potenciales e inadecuados (18). Esta información tiene gran impacto desde el punto de vista de salud pública para alertar sobre las posibles regiones en riesgo de presentar brotes por este patógeno (17, 18).

Con el propósito de estudiar la epidemiología de *C. neoformans*/*C. gattii* , se han implementado una amplia variedad de técnicas de biología molecular como PCR huella Digital (26), Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción de los genes PLB1 y URA5 (RFLP) (27-29), Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) (30) y recientemente se utiliza el esquema de tipificación de secuencias multilocus (MLST) (31-33) en la cual se emplean siete genes conservados (CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 e

IGS1), esta técnica permite realizar de manera más robusta la genotipificación de los aislamientos del complejo para determinar su clonalidad, es altamente discriminatoria para un gran número de patógenos, mide directamente los cambios en la secuencia de una serie de genes conservados, caracteriza los aislamientos mediante su perfil alélico y es una excelente herramienta para la caracterización taxonómica a nivel molecular (31).

C. neoformans y *C. gattii* a menudo causan infección crónica en los seres humanos y en animales (34**)**, existen evidencias de que la incapacidad del huésped para eliminar la infección depende de la interacción con las células fagocíticas y en la cápsula de polisacárido que rodea las células criptocócicas (35-37) por consiguiente la cápsula se considera el mayor factor de virulencia (38). Sin embargo, cuando *C. neoformans* y *C. gattii* cambia de ambiente o infecta a un huésped experimenta cambios que contribuyen a su persistencia, como la ampliación de la cápsula, morfología y la aparición de células gigantes (39-41). En los últimos años se ha estudiado la respuesta inmune de esta levadura para sobrevivir en diferentes modelos animales; uno de los modelos ampliamente utilizado en resientes estudios es *Galleria mellonella* donde la levadura es capaz de proliferar en el hemocelo de la oruga y puede sobrevivir a temperatura fisiológica; además que se puede explorar los factores de virulencia que pueden estar implicados en la infección de *C. neoformans* y *C. gattii*, llegando a realizar análisis de supervivencia (42-43).

Las investigaciones realizadas por el Grupo Colombiano para el Estudio de la Criptococosis, sobre la situación clínica y epidemiológica en el país, indican que la incidencia ha aumentado por la pandemia de VIH; para el periodo 2006-2012 la incidencia promedio anual fue de 3,3 casos x 10^3 habitantes/año en pacientes con SIDA y en el periodo 1997-2005 fue de 3,0 casos x 10^3 habitantes/año. En la población general se mantiene en 2.4 x 10^6 habitantes/año para los dos periodos antes mencionados (3). El 95,9% de los aislamientos clínicos reportados corresponden a

C. neoformans var. *grubii* (serotipo A), 3,4% de los casos a *C. gattii* (serotipo B), 0,5% de los casos a *C. gattii* (serotipo C) y 0,3% a *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D), siendo Norte de Santander, el departamento con mayor frecuencia de casos reportados de criptococosis (77%) por causa de *C. gattii* en pacientes inmunocompetentes (3,44).

Adicionalmente, en nuestro país se han realizado diversos trabajos ambientales que describen la importancia y una potencial relación con aislamientos clínicos. En estos trabajos se han recuperado aislamientos de los serotipos A, B y C, a partir de diversas fuentes como *Eucalyptus sp*, *Ficus sp* y *Terminalia catappa*, entre otros y describen técnicas de recuperación de muestras ambientales. (11,45-51). La evidencia ya descrita demuestra que la criptococosis puede llegar a ser un problema para la salud pública en Colombia**.**

El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar la relación genética entre aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* en seis departamentos de Colombia a través de la tipificación de secuencias multilocus, además de relacionar las secuencias tipo encontradas con los principales factores de virulencia que presenta la levadura, mediante pruebas fenotípicas y un modelo invertebrado. Adicionalmente, con la información de los estudios ecológicos y con los datos suministrados por la encuesta nacional sobre la criptococosis, la ubicación geográfica de áreas en Colombia donde se reportan datos clínicos y ambientales, la descripción de condiciones ecológicas que se relacionan posiblemente con el hábitat de *C. neoformans/C. gattii*, se pretendió determinar las áreas donde el hongo puede encontrar condiciones favorables para su desarrollo y acercarse más a la epidemiología de este patógeno en Colombia.

2. Justificación

La criptococosis es una infección micótica de distribución mundial, causada por las especies *C. neoformans* y *C. gattii*, la frecuencia de la criptococosis ha aumentado significativamente en los últimos años a nivel mundial (16, 19-25). En el último estudio publicado por el grupo Colombiano para el Estudio de la Criptococosis del año 2012 señalan que la incidencia anual de la criptococosis es de 3,3 casos x 10^3 habitantes en pacientes con SIDA y en la población general en 2.4 casos x 10^6 habitantes para el periodo 2006-2010, la incidencia de pacientes con SIDA ha aumentado con respecto en lo reportado en el periodo 1997-2005 (3).

En Colombia las investigaciones realizadas empleando las técnicas de tipificación molecular de aislamientos clínicos y ambientales por PCR huella digital y RFLP, han generado hipótesis de una posible relación entre estos dos grupos de aislamientos (27, 51), teniendo en cuenta que la infección se adquiere presuntamente por la inhalación de los propágulos presentes en el ambiente. Aunque estos resultados han sido de gran importancia y han generado conocimiento acerca de la epidemiología de este patógeno en nuestro país, los resultados no han sido suficientes para sugerir que la infección clínica se debe a cepas circulantes en el ambiente. El MLST detecta directamente los cambios en la secuencia de una serie de genes de expresión constitutiva (housekeeping genes), esta técnica nos permitirá definir más en detalle si hay o no correlación entre aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans/ C. gattii*, siendo de gran importancia para el país, ya que se trata de una nueva técnica para el estudio de la epidemiología molecular de este patógeno. Así mismo, el estudio de la distribución geográfica y condiciones macro ecológicas de los aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans/ C. gattii* permitirá establecer medidas de control y prevención.

El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar la relación genética entre aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans*/ *C. gattii* en Colombia, con el fin de identificar posibles clones, además de explorar si existe una relación de las secuencias tipo encontradas con factores de virulencia. Adicionalmente, con la información de los estudios ecológicos y los casos clínicos, se pretende determinar las áreas donde el hongo puede encontrar condiciones favorables para su desarrollo, este conocimiento aportará información acerca de la epidemiología, ecología y etiología de este patógeno en Colombia.

Este estudio hace parte del proyecto “Predicción de posibles áreas endémicas para *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* en Colombia: modelo ecológico de áreas en riesgo” liderado por el Grupo de investigación de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, cofinanciado por Colciencias (código: 2011-3600115683).

3. Marco de referencia

3.1 Historia

El científico italiano Sanfelice en 1894 observó por primera vez un aislamiento de *Cryptococcus* de la fermentación de zumo de melocotón, observó microscópicamente una levadura encapsulada a la que llamó *Saccharomyces neoformans*; al mismo tiempo en 1894 y 1895 Busse y Buschke por separado informaron del primer caso de la enfermedad en humanos causada por este hongo, se recuperó de la lesión tibial de un paciente, a la que llamó "*Saccharomycosis hominis";* en los años siguientes este patógeno se aisló de lesiones en hombres y en animales (4,7).

Curtis en 1896, aisló esta levadura de un absceso inguinal de un paciente francés, al inocular subcutáneamente diversos animales de experimentación observó la formación de lesiones tumorales en pulmón, bazo y riñones, él nombro esta cepa como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* (7, 52).

En 1901 Vuillemin al estudiar esta levadura antes reportada por Sanfelice y Busse, los cuales clasificaron sus aislamientos en el género de *Saccharomyces*, no encontró las típicas ascosporas del género, adicionalmente éstas no fermentaban los carbohidratos y las clasificó en el género *Cryptococcus*; de esta forma nombró al primer aislamiento clínico de Busse como *C. hominis* y *C. neoformans* para los aislamientos de Sanfelice (7,53).

En diferentes años se realizaron diversos estudios, los cuales clasificaban de forma diferente esta levadura, este hecho causaba cierta confusión en diversas investigaciones al hablar de diferentes géneros teniendo características similares en el reporte de la levadura observada; en 1935 el científico Rhoda Benham aclaró los diferentes nombres que se habían atribuido a esta levadura con los aislamientos de Sanfelice, Busse y Buschke encontrando que estas cepas eran indistinguibles; desde esta investigación el género *Cryptococcus* fue aceptado (7,54).

Emmons en 1951 recuperó *Cryptococcus* de material vegetal en Virginia; adicionalmente describe en 1955 la recuperación de *Cryptococcus* en muestras de excrementos de aves; propuso que la exposición a los excrementos de aves contaminadas está relacionada con las infecciones en hombres y animales (55). Kwong Chung en 1975 describe como una levadura perteneciente al reino de los hongos que presenta una fase anamorfa (fase asexual), lo clasifica en phylum *Deuteromycota*, clase *Blastomicetes*, orden *Cryptococcales*, familia *Cryptocacceae*, genero *Cryptococcus* (del griego Kryptos que significa escondido) (7,56).

3.2 Agente etiológico

Existen más de 30 especies de *Cryptococcus*, dos de ellas son los principales patógenos en seres humanos y animales, a saber *C. neoformans*/ *C. gattii*; estas especies conforman el complejo de la criptococosis, infección oportunista que afecta a personas inmunocomprometidas e inmunocompetentes; se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial, en material vegetal en descomposición y excremento de aves (1-4,57-58).

En el pasado el agente etiológico de la criptococosis se consideraba una especie homogénea (*C. neoformans*), ésta fue separada sobre la base de numerosas diferencias tanto para *C. neoformans* como *C. gattii*, como la distribución geográfica, los nichos ecológicos, la epidemiología, presentación clínica y características moleculares (5,59).

C. neoformans /C. gattii: estas especies son levaduras que tiene forma esférica, capsulada, de tamaño variable; la cápsula es una estructura con características morfológicas importantes, compuesta por varios polisacáridos, glucoroxilomanano, galactoxilomanano y manoproteina. Las diferencias en la estructura del glucoroxilomanano explican las variaciones antígenicas y es la base de la separación de los serotipos existentes A, B, C, D, AD (5, 56).

C. neoformans, lo conforman dos variedades, var. *grubii* (serotipo A) y var. *neoformans* (serotipo D), adicionalmente conforman el hibrido AD, se encuentra distribuido a nivel mundial; *C. neoformans* var. *grubii* se ha aislado principalmente del suelo contaminado con excrementos de palomas y otras aves. C. *neoformans* var. *neoformans* es principalmente reportado en Europa Occidental, afectando en su mayoría a personas inmunocomprometidas, con frecuencia los casos asociados con VIH/SIDA o con cualquier paciente inmunocomprometido; el tipo de criptococosis más común es la meningoencefalitis por *Cryptococcus* (60-65).

C. gattii está conformado por los serotipos B-C y en la actualidad se han descrito nuevos híbridos entre los serotipos BD y AB. El hibrido BD fue aislado en tres pacientes inmunocompetentes en los países bajos (66), el hibrido AB se aisló de un paciente inmunocomprometido en Canadá (2). *C. gattii* se encuentra distribuido en regiones tropicales, subtropicales y templadas (16-17, 67-69), afectando en su mayoría a personas aparentemente inmunocompetentes; en la naturaleza se ha recuperado de restos vegetales de árboles como *Eucaliptus sp*, *Terminalia catappa*, entre otros, se ha reportado en los últimos años en Austria, Italia, España, Países Bajos, Japón, Corea del Sur, India, Colombia (46, 68-77).

Las infecciones causadas por *C. gattii* se presentan habitualmente en personas inmunocompetentes; en su mayoría los casos son asociados con criptococosis meníngea afectando principalmente al sistema nervioso central (3, 16, 19, 25).

3.3 Criptococosis

Se cree que la enfermedad es iniciada por la inhalación de propágulos presentes en el ambiente, que pueden provenir de material vegetal y excremento de aves, la infección usualmente es asintomática o puede resultar en una neumonía autolimitada (78). No obstante presenta mayor

afinidad a diseminarse de manera hematógena al sistema nervioso central (SNC) y a otros tejidos extrapulmonares como la piel, el esqueleto, los ojos y otros órganos viscerales (79).

Los síntomas más importantes son cefalea, fiebre, vómito, malestar general y alteraciones de la conciencia. Dentro de los signos clínicos se encuentran rigidez nucal, papiledema, hallazgos focales, signos meníngeos y alteración de los pares craneanos, la evolución de los síntomas varía en su presentación y ésta puede ser de días a años (80).

Entre las manifestaciones clínicas se encuentran las expresiones pulmonares que en general presentan síntomas inespecíficos, aunque la insuficiencia respiratoria grave ha sido reportada tanto en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes (81). La meningitis o las lesiones focales cerebrales constituyen el cuadro clínico más típico, tiene como manifestaciones clínicas cefalea, nausea, mareo, irritabilidad, disminución en la comprensión y en la agudeza mental, cambios en la personalidad, visión borrosa o doble y fiebre, entre otras (80,82).

La diseminación al sistema nervioso central puede verse reflejada en meningitis o meningoencefalitis, las cuales puede ser aguda, sub-aguda o crónica (83). En personas inmunosuprimidas la respuesta inflamatoria meníngea es rara, ya que las formas de presentación son menos sintomáticas que en pacientes inmunocompetentes donde la presentación clínica es severa, es habitual la presencia de lesiones granulomatosas denominados criptococomas (79-86).

En la piel se denomina criptococosis cutánea, ésta puede ser primaria donde usualmente ocurre en áreas de trauma previo como una lesión por la mordedura de algún animal (87) o secundaria donde las lesiones pueden ser múltiples y diseminadas, ubicadas tanto en áreas del cuerpo expuestas y no expuestas, principalmente en la cabeza y cuello (88).

El diagnóstico se puede realizar por examen directo, antigenemia o por cultivo. El examen directo de la muestra se realiza habitualmente; éste se basa en la observación mediante montaje

con tinta china diluida en solución salina o la observación con microscopio de contraste de fase. En los dos casos se observan blastoconidias redondas u ovaladas, rodeadas por un gran halo claro que corresponde a la cápsula. Por lo general el líquido cefalorraquideo (LCR) presenta anormalidades en la mayoría de los pacientes aunque también se puede observar en esputo, lavado broncoalveolar, orina, biopsias, sangre, medula ósea, entre otros (89-90). El diagnóstico indirecto se realiza mediante serología, es una técnica que detecta antígenos capsulares en sangre o LCR, entre las técnicas disponibles para la detección del antígeno polisario capsular se encuentra la aglutinación con látex y el inmunoensayo enzimático. El cultivo se realiza en medios para hongos como el agar Sabouraud dextrosa, donde el *C. neoformans* y *C. gattii* forma colonias blancas de aspecto mucoide (91, 92).

La enfermedad afecta en mayor proporción a hombres que a mujeres de cualquier edad, raza y condición socio económica. Las personas con predisposición a adquirir la enfermedad son pacientes con enfermedades crónicas como diabetes, cirrosis, falla renal y algún tipo de tumor o trasplante, enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, leucemias, linfomas, con tratamiento con corticosteroides, pacientes VIH/SIDA, (se considera un marcador de esta inmunodeficiencia por ser la cuarta enfermedad que afecta a estos pacientes), entre otros (90, 93).

La visualización del complejo por histopatología, se realiza en biopsias, con base en las coloraciones de rutina (hematoxilina- eosina y acido periódico Schiff) o coloraciones especiales (mucicarmina de Meyer, platametenamina), donde se observa en el tejido zonas quísticas con levaduras encapsuladas (93).

3.4 Factores de virulencia.

Entre los factores de virulencia de *C. neoformans*/ C. *gattii* se encuentran la cápsula, la capacidad de adherencia y las proteínas con actividad enzimática, como la fosfolipasa, proteinasa, fenoloxidasa y la ureasa, crecimiento a 37 °C, switching fenotípico y pareja sexual (94-96).

3.4.1 Cápsula

El polisacárido capsular contiene principalmente glucuronoxylomanano, confiere protección al aumentar su tamaño capsular dentro del huésped donde impide la fagocitosis (97).

3.4.2 Actividad enzimática

La melanina inactiva los mecanismos de muerte intracelular, la producción es realizada por una enzima llamada lacasa, la cual en gran producción protege al hongo frente a los oxidantes generados por las células efectoras del huésped (94, 98). Las proteínas con actividad enzimática como la fosfolipasa, contribuyen a la degradación de la membrana de la célula huésped y por lo tanto a la lisis celular (94,99). Se ha demostrado que la proteinasa degrada las proteínas del huésped que incluye colágeno, elastina, fibrinógeno, inmunoglobulinas y factores del complemento, fenoloxidasa y la ureasa, permite al hongo alterar los niveles de pH en el fagolisosoma en la cual degradan proteínas en el hospedero que generan respuesta inmune, así como favorecen la invasión mediante el daño de membranas celulares protegiendo así al hongo de la fagocitosis (98-100).

3.4.3 Crecimiento a 37 °C

La capacidad para crecer a temperatura fisiológica es un factor de virulencia muy importante ya que le permite causar infección en mamíferos (76, 82, 87, 94).

3.4.4 Switching fenotípico

Se produce mediante el cambio morfológico espontáneo en la expresión génica con el fin de escapar al reconocimiento por el sistema inmune y para adaptarse a un nuevo entorno, es un fenómeno reversible (101-102). La primera detección de cambio fenotípico en *Cryptococcus* fue reportado por Fries y Casadevall en 1998 (102). El cambio fenotípico siempre conduce a cambios en la virulencia, causando cambios en la cápsula o la morfología de la pared celular que se evidencia de forma macroscópica por observación directa de las colonias, en el cambio a colonias mucoides se observan cápsulas más grandes, las colonias lisas poseen cápsulas más delgadas permitiendo un mejor cruce de la barrera hematoencefálica (103, 104).

3.4.5 Reproducción

Las dos especies *C. neoformans / C. gattii* han mostrado capacidad de reproducción sexual o telomorfa y reproducción asexual o anamorfa. La forma sexual genera basidiosporas (propágulo de forma sexual). La forma asexual genera blastoconidias (propágulo de forma asexual) (105, 106).

La reproducción sexual de esta levadura es heterotálica con un locus MAT con dos alelos (a y α) que controlan la pareja sexual (107). Las blastoconidias pueden presentar pareja sexual a o α ha sido demostrada in vitro por la producción de teleomorfos basidiomicetos, siendo la pareja sexual MAT α la que presenta predominancia, son capaces de hacer reproducción asexual y se presenta

en una mayor concentración en el ambiente. El proceso mediante el cual ocurre el apareamiento se divide en seis etapas: conjugación, filamentación, formación de basidios, fusión nuclear, meiosis y esporulación (108). La reproducción asexual se da por gemación de sus blastoconidias y de forma alternativa mediante un proceso llamado fructificación haploide, se da en medios con limitaciones severas de nitrógeno o agua (108).

3.5 Modelo invertebrado de virulencia "*Galleria mellonella"*

La virulencia de los patógenos humanos se ha estudiado clásicamente en mamíferos, siendo el ratón el modelo más utilizado. En los últimos años, se ha mostrado interés por el uso de otros modelos alternativos no vertebrados como *Galleria mellonella*, debido a los costos y las implicaciones bioéticas que supone la experimentación con modelos mamíferos (42-43, 109-110).

Las larvas de *G. mellonella* se utilizan para el estudio de la virulencia en diferentes microorganismos como: *Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Escherichia coli*, entre otros (111-113). En los hongos patógenos *G. mellonella* se ha utilizado para estudiar la virulencia de *C. neoformans*/C. *gattii, Candida albicans, Candida tropicalis, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides lutzii,* entre otros (114-117).

G. mellonella induce una respuesta inmune innata frente a la infección, basada en la presencia de hemocitos con capacidad fagocítica, lo que se asemeja a la actividad que ejercen macrófagos neutrófilos durante la respuesta inmune innata en mamíferos (116-118).

Se han demostrado cambios similares durante la infección en modelos murinos y *G. mellonella* en *C. neoformans* y *C. gattii*, lo que indica que este modelo puede utilizarse para el estudio de cambios morfológicos durante la infección, incluyen el incremento en el tamaño de la cápsula y

la formación de células gigantes (118), los cuales se piensa que son importantes para la supervivencia del hongo en el huésped. La utilización de este modelo puede ayudar a entender los mecanismos que resultan en el desarrollo de la infección causada por *C. neoformans y C. gattii* (42-43, 109, 118).

3.6 Diversidad genética.

Debido a la importancia de *C. neoformans*/C. *gattii* como hongos patógenos humanos, varios grupos de investigación se centran en la caracterización genotípica, para lo cual se han descrito diversas técnicas de tipificación molecular como lo son: la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) (119), PCR Huella Digital (26), Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD) (120), Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) (30), RFLP del gen PLB1 o URA5 (27-28) y más recientemente, el MLST (31-33).

Algunas de las técnicas anteriormente mencionadas han permitido agrupar a los miembros del complejo en 8 patrones moleculares principales: *Cryptococcus neoformans*: var *grubii* (VNI/AFLP1, VNII/AFLP1A), var *neoformans* (VNIV/AFLP2) y VNIII/AFLP3 (híbrido AD), por su parte *Cryptococcus gattii* (VGI/AFLP4, VGII/AFLP6, VGIII/AFLP5, VGIV/AFLP7) (26,30). Recientemente, AFLP y MLST han demostrado la existencia de un nuevo tipo molecular en Botswana (genotipo VNB) que parece estar restringido geográficamente a África subsahariana (33).

El patrón molecular clínico más frecuente es VNI, y a su vez éste es el más comúnmente recuperado del ambiente (20, 24-27**).** El patrón molecular VNII se reporta en menor proporción en muestras clínicas y en la recuperación ambiental (27), los patrones moleculares VNIII y VNIV se han reportado con mayor frecuencia en Europa (63); a diferencia de C. neoformans, C. gattii no presenta un tipo de patrón molecular frecuente a nivel clínico; éstos son cambiantes y se

mantienen poco frecuentes en el tiempo, en muestras ambientales el patrón molecular VGI se reporta con mayor frecuencia en Australia (120), el patrón VGII en Sur y Norte America (20,121-122), siendo el patrón que ha ocasionado el único brote reportado a nivel mundial en la Isla de Vancouver y en el pacífico norte de Estados Unidos (16). El patrón molecular VGIII predomina en países Iberoamericanos, aunque existen reportes en Nuevo Méjico y en India (27, 123-124), el patrón VGIV, se encuentra en África del Sur y América Central (Méjico) (16, 125).

Los diferentes resultados obtenidos por las técnicas de tipificación molecular en diversas investigaciones no eran comparables , por esta razón en 2009 Meyer W et al., realizaron el esquema consenso de secuencias multi-locus para *C. neoformans* y *C. gattii*, establecido por la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM) utilizando siete loci genéticos CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 y IGS1. Adicionalmente acordaron la nomenclatura mundial de los ocho principales tipos moleculares entre las dos especies y describieron la nomenclatura por la cual se debe nombrar cada patrón molecular dependiendo de la técnica de genotipificación implementada (31).

3.7 Epidemiología y ecología

A principios de la década de 1980, fecha en la cual se produjo la aparición de la inmunodeficiencia causada por el VIH/ SIDA, se incrementaron los reportes de criptococosis; antes la criptococosis ocurría esporádicamente en todo el mundo. En adultos el VIH/ SIDA es el principal factor de riesgo para adquirir la criptococosis (1,3-4, 94,126).

A nivel mundial, las infecciones por *C. neoformans* y *C. gattii* causan aproximadamente un millón de casos de meningitis criptocócica por año entre las personas con VIH/SIDA, lo que resulta en cerca de 625.000 muertes (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, CDC, Atlanta, EE.UU., http: / /www.cdC.gov/). La mayor carga de la enfermedad se produce en

el África subsahariana, donde se estima que la mortalidad oscila entre un 50% a un 70% (127-128).

El CDC de Atlanta indica que sólo el 1 % de la población infantil menor de 13 años infectada por el VIH/SIDA contrae la enfermedad (129). En Sudáfrica, en el mayor estudio realizado hasta la fecha, la incidencia de la criptococosis en los niños VIH positivos fue de 47 casos por cada 100.000 (23). En Brasil, la criptococosis causada por *C. gattii* infecta principalmente a los jóvenes y los niños en las regiones Norte y Noreste de Brasil. En este grupo de pacientes, la infección se caracteriza por una alta tasa de letalidad que va desde 40,6% a 56% (62,130). En Colombia, la cifra de prevalencia de criptococosis en niños menores de 16 años es de 2,6%, con mayor frecuencia en niños que en niñas, el menor de los niños reportado fue un neonato de 13 días de nacido (44, 131).

Con la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) a mediados de los años 90 en algunos países como EEUU, se observó una disminución de la incidencia de la criptococosis (132). En África subsahariana, se observa una leve disminución como lo muestra un estudio prospectivo de pacientes con criptococosis meníngea en la ciudad del Congo realizado en el Hospital Jooste recientemente (133).

Dentro de los factores de riesgo, se encuentran la exposición a fuentes ambientales del hongo y factores del hospedero no identificados (6). Se ha encontrado que las enfermedades pulmonares crónicas, el cáncer y las alteraciones del estado inmune como neoplasias, son condiciones que favorecen la colonización por *Cryptococcus* (134-136).

El género *Cryptococcus* es ubicuo en el mundo; éste puede sobrevivir en una variedad de nichos ambientales, la supervivencia puede estar influenciada por factores como el pH, la humedad, la

temperatura, la propagación del hongo en el ambiente se da por la dispersión aérea ; el brillo solar ejerce una acción letal sobre esta levadura (58).

La criptococosis también ha sido documentada en especies animales como gatos, perros, ovejas, caballos, marsupiales, koalas, cabras, entre otros, en varias regiones incluidas África, Australia, Nueva Zelanda y España (137-141).

3.8 Brote por *C. gattii* en Vancouver, Canadá

En 1999 se describió por primera vez un brote de criptococosis en animales y humanos aparentemente sanos causado por C. *gattii* serotipo B patrón molecular VGIIa y VGIIb. A partir de esa fecha, se han diagnosticado en la isla diversos casos de criptococosis pulmonar y del sistema nervioso central, todos debidos a C. *gattii*, serotipo B. El brote ha producido más de 236 casos confirmados, con 19 muertes y una incidencia anual de criptococosis en la isla de 37 x 10^6 casos por habitantes, para el período 2002-2005, la más alta informada mundialmente, siendo endémico para esta zona del mundo (16-17).

Por otra parte, se han reportado casos de C. *gattii* en animales y humanos en otras regiones de Columbia Británica, la costa pacífica noroccidental al noroeste del Pacífico del estado de Washington, Oregón y California en los Estados Unidos, sugiriendo la dispersión de este patógeno (16-17,22).

El modelo de nicho ecológico proporcionó predicciones muy precisas mayores al 98% de exactitud para *C. gattii*; se encontraron nichos ecológicos óptimos a lo largo de la costa central y sur oriental de la isla de Vancouver y en Vancouver Lower Mainland (18).

3.9 El modelo de nicho ecológico.

El nicho ecológico se define como el conjunto de condiciones físicas y biológicas bajo las cuales una especie puede mantener su población sin inmigración; en este concepto se distingue un el

nicho fundamental (aspectos del espacio o hipervolumen, es decir, área total que cumple con todos los requisitos físicos y biológicos de una especie) y el nicho restringido o efectivo (determinado por una variedad de factores como la dispersión, historia y barreras físicas que mantienen una población viable incluso con depredadores y competidores) (142-144).

Un estudio realizado en Columbia Británica empleó un modelo de nicho ecológico, basándose en los datos de los muestreos ambientales y la vigilancia de los casos clínicos, para predecir las áreas geográficas que tienen las condiciones ecológicas adecuadas para mantener la colonización permanente de C. *gattii* en la Columbia Británica, definiendo sitios como óptimos, potenciales e inadecuados. Esta información tiene gran impacto desde el punto de vista de salud pública para alertar sobre las posibles regiones de contagio de este patógeno (18).

El programa computacional Genetic Algorithm for Rule-set Prediction (GARP) de gran precisión y desempeño en la predicción del nicho ecológico ha sido ampliamente usado para predecir el modelo de nicho ecológico en diversas especies (17, 145-146). Fue desarrollado por Stockwell y Peters en 1999 (146), este programa utiliza un superconjunto de reglas para identificar el nicho ecológico de una especie basado en la presencia de la especie, la ausencia combinando los valores ecológicos y topológicos, para lo cual maneja puntos de entrada y salidas, y empareja los datos para que todos los análisis estén alineados con el modelo. En los últimos años se ha empleado este programa en la predicción de algunas especies de hongos en diferentes partes del mundo. En el 2005 Fisher M y colaboradores, describieron la baja dispersión eficaz de genotipos asexuales en *Penicillium marneffei*, identificaron la presencia del hongo en el sureste de Asia; aplicando GARP a esta investigación demostró que el hongo puede dispersarse en diferentes ambientes pero no puede mantenerse en estos debido a que el hongo ha prescindido en gran medida de la reproducción sexual, lo que significa que su capacidad de adaptarse es limitada

(147). Baptistar R, et al., en el 2007, realizaron un modelo de nicho ecológico fundamental en coccidioidomicosis en el sur de California y Arizona (EE.UU.) y Sonora (México) utilizando variables ambientales y los puntos de referencia geoespacial, modeladas en GARP y en el sistemas de Información Geográfica (SIG), identificando la presencia del hongo en las zonas del sur de California, Arizona, Texas, Baja California y el norte de México. En esta investigación sugieren que el nicho ecológico fundamental más probable de *Coccidioides* spp. se encuentra en las tierras áridas de los desiertos de América del Norte (148).

La ecología de *C. neoformans* y *C. gattii* es poco conocida, en parte porque es muy difícil identificar el nicho (s) que ocupa; GARP utiliza mapas digitales para resumir las variables ambientales, identifica las asociaciones entre los datos de punto de ocurrencia y sus dimensiones ecológicas. Emplea conjuntos de reglas que definen un nicho con la exactitud de predicción más alta (puntos conocidos), posteriormente se utilizan para generar mapas con áreas de presencia y ausencia. El modelo ha sido usado ampliamente para predecir la distribución espacial de las especies relacionando las características ambientales de observaciones en campo, con variables vaticinadoras (18).

3.10 Criptococosis en Colombia.

Estudios clínicos

La evidencia ya descrita demuestra que la criptococosis puede llegar a ser un problema para la salud pública en Colombia. La incidencia promedio anual reportada es de 2.4×10^6 habitantes en la población general y en pacientes con SIDA de 3,3 casos x 10^3 (3,44) y la prevalencia de criptococosis en niños menores de 16 años es de 2,6% (3), según los datos por el Grupo Colombiano para el Estudio de la Criptococosis.

La criptococosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, en pacientes VIH, en Colombia, la criptococosis meníngea es la segunda infección oportunista más frecuente en estos pacientes, en el país se han realizado diversas investigaciones encaminadas a entender, responder y manejar la enfermedad en pacientes.

Lizarazo et al., el año 2000, analizo una cohorte de pacientes en un año donde el curso de la enfermedad fue severo debido a que el 37% de los pacientes murieron, los pacientes que superaron la enfermedad sufrieron pérdida de la agudeza visual y/o de la visión, los autores destacan la severidad de la afección por *C. gattii*, su mortalidad y la morbilidad (149).

Castañeda, et al., en el 2012 proponen un protocolo de estudio y manejo de pacientes con criptococosis. Ellos describen la presentación de la enfermedad según las características demográficas, epidemiológicas, factores de riesgo, manifestaciones clínicas, tipos de diagnósticos y manejo de complicaciones (150). En el año 2012 Lizarazo et al., proponen una serie de consideraciones y ventajas al realizar un diagnóstico temprano de la criptococosis en pacientes con SIDA asintomáticos con recuentos de células CD4+/µl < 100/µl, en paciente que no han recibido Terapia antiretroviral (TAR) por medio de pruebas inmunológicas rápidas (aglutinación de partículas de látex y ELISA) (151). Ese mismo año Escandón et al. proponen la implementación de una prueba de flujo lateral para la determinación del antígeno capsular en suero, ya que representa un gran avance debido a su bajo costo, su fácil implementación y su alta sensibilidad y especificidad del diagnóstico (152).

La vigilancia nacional pasiva ha permitido explorar el comportamiento de la criptococosis en nuestro país, como lo refleja el estudio Lizarazo, et al., en el 2014. Con base en la Encuesta Nacional de criptococosis, se realizó un análisis epidemiológico y clínico de los casos de la enfermedad observada en los niños menores de 16 años entre 1993-2010, y se encontró una

prevalencia de 2,6% de niños afectados. *C. neoformans* (VNI 85,3%, VNII 8,8%) fue aislado en 94,1% de los casos y *C. gattii* (VGII) se aisló en el 5,9% de los casos (131). Ese mismo año Lizarazo, et al., en colaboración con el laboratorio de Micología Molecular de la Universidad de Sydney en Australia, realizó un estudio retrospectivo de las manifestaciones clínicas y epidemiológicas de la criptococosis por *C. gattii*; casos reportados por la vigilancia pasiva entre 1997-2011 evidencian una alta diversidad genética entre aislamientos clínicos, así como el predominio del patrón molecular VGII asociado con una alta virulencia. Adicionalmente recalcan que Colombia reporta una baja prevalencia anual para *C. gattii* donde es relevante resaltar el comportamiento particular del departamento del Norte de Santander ya que representa el 33,3% de los casos por *C. gattii* en nuestro país (153).

Estudios ambientales

En Colombia se han realizado diversos trabajos ambientales que describen la importancia ecológica y una potencial relación con aislamientos clínicos. En algunos de estos trabajos se han recuperado aislamientos de los serotipos A, B y C, a partir de diversas fuentes como *Eucalyptus* sp, *Ficus* sp y *Terminalia catappa*, entre otros. Estos primeros estudios son iniciados por Ordoñez en 1994 donde determinó la variedad y el serotipo de 192 aislamientos de *C. neoformans* recuperados de 1972 a 1992 de origen clínico y ambiental. En este estudio reportaron la existencia de *C. neoformans* (la más frecuente en aislamientos clínicos, así como ambientales) y *C. gattii*. Se observaron tres serotipos en aislamientos clínicos, siendo el más frecuente el serotipo A, seguido del B y C, este último fue reportado por primera vez en la ciudad de Cúcuta en arboles de almendro por medio de esta investigación (47).

Más tarde Castañeda A. y colaboradores en el 2001 recuperaron *C. gattii*, serotipo C a partir de detritos de almendros, concluyendo que este tipo de árbol puede tener algún papel como planta

intermediaria para C. *gattii*, recuperándose en todos los meses del año que duró el estudio (45). En el mismo año los autores describen la asociación de *Cryptococcus* con *Eucalyptus* en un parque de Bogotá el cual se encontró en un 4% de las muestras recolectadas durante 2 años (48). En el 2002 Escandón y colaboradores inocularon experimentalmente almendros con un aislamiento ambiental de *C. gattii* serotipo C, realizaron el seguimiento detallado de la asociación planta-hongo, observando que la planta permanecía viable hasta por un periodo de 12 meses pos-inoculación y que podía migrar desde el suelo hasta el tallo y viceversa, sin alterar fisiológicamente la planta (154).

Huérfano y colaboradores en el año 2003 evaluaron las características fenotípicas de aislamientos ambientales de *C. neoformans*, con el fin de establecer diferencias con el ciclo de vida y la virulencia. Ellos encontraron que la expresión de factores asociados con la virulencia fue mayor para los aislamientos de la variedad *grubii* y observaron que *in vitro* es probable obtener basidiosporas asexuales y blastoconidias pequeñas y poco capsuladas, lo cual puede ser de gran importancia en el ciclo de vida del hongo (155).

Catañeda A y colaboradores en el 2004, realizaron la evaluación de varias técnicas de extracción de ADN de *Cryptococcus* sp. a partir de muestras ambientales, logrando la extracción y amplificación de ADN de *Cryptococcus* sp. a partir de muestras ambientales (49).

Escandón y colaboradores en el 2005 reportaron por primera vez en muestras de detritos de *Eucalyptus* en el departamento de Cundinamarca la presencia de *C. gattii*, serotipo B, pareja sexual a (11).

En el año 2006 Granados y colaboradores analizaron la relación entre la presencia de los serotipos de *C. neoformans/C. gattii* en muestras de árboles y las condiciones climáticas registradas durante muestreos en cuatro ciudades de Colombia, entre 1992 y 2004; los autores

sugieren que las condiciones climáticas ambientales, principalmente humedad, temperatura, evaporación y radiación solar, pueden afectar la ocurrencia de los diferentes serotipos en los árboles de una manera diferencial. Estas variaciones climáticas se reflejan en la distribución geográfica de los serotipos en Colombia (50).

Entre los estudios hechos por el Grupo de Microbiología en el 2006, se analizó la diversidad genética de aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* por PCR huella digital con M13, $(GACA)_4$ y $(GTG)_5$ y por RFLP del gen URA_5. La tipificación molecular agrupó los aislamientos clínicos en el patrón molecular VNI en un 97,5% y en aislamientos ambientales en VGII con un 80%, Escandón *et al.* sugieren que los pacientes pueden adquirir la infección a través de la exposición en el ambiente (51).

En el año 2010 Escandón y colaboradores, reportan aislamientos de *C. gattii* patrón molecular VGIII, pareja sexual a en árboles de *Corymbia ficifolia* en la ciudad de Bogotá. Este estudio representa un importante hallazgo ya que reporta *C. gattii* en arboles de *C. ficifolia* y añade información a la amplia variedad de especies de árboles de los cuales *C. gattii* se puede recuperar (156).

Firacative C. y colaboradores en el 2011 realizan el primer reporte ambiental de *C. gattii* serotipo B, en Cúcuta, Colombia a partir de detritos de *Ficus sp* (13).

4. Propósito de investigación

La presente investigación tiene como propósito genotipificar aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* en Colombia por tipificación de secuencias multilocus (MLST), con el fin de identificar la presencia de posibles clones. El alcance de la presente investigación es establecer la correlación de aislamientos clínicos y ambientales mediante la identificación de perfiles alélicos y la comparación de aislamientos colombianos con secuencias tipo reportadas a nivel mundial; además se pretendió explorar la relación de las secuencias tipo con los diferentes factores de virulencia, mediante pruebas fenotípicas y un modelo invertebrado, finalmente con la recopilación de los datos ambientales y casos clínicos, la ubicación geográfica de los mismos y la caracterización de condiciones macro-ecológicas relacionadas con el hábitat de *C. neoformans/C. gattii*, se determinaron las áreas donde el hongo puede encontrar condiciones favorables para su desarrollo.

4.1 Preguntas de investigación

- ¿Existe una asociación entre los perfiles alélicos de aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii*?
- ¿Existe una relación entre las secuencias tipo y los principales factores de virulencia?*
- ¿Existe una diferencia en la distribución geográfica entre las especies de *C. neoformans* y *C. gattii* y sus secuencias tipo?

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar y relacionar los perfiles alélicos de aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* provenientes de seis departamentos Colombia mediante MLST.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el perfil molecular de aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* por PCR huella digital y Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen URA5.
2. Determinar el genotipo en un grupo de aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* mediante Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST) de 7 loci.
3. Estudiar los principales factores de virulencia por cada secuencia tipo identificada de *C. neoformans* y *C. gattii*.
4. Determinar si existe una diferencia en la distribución geográfica entre las especies de *C. neoformans* y *C. gattii*, delimitando áreas donde el hongo se puede dispersar en el futuro, empleando el modelo de nicho ecológico.

6. Materiales y métodos

6.1 Diseño del estudio

El presente estudio epidemiológico es de tipo descriptivo molecular, el cual se desea conocer si existe correlación entre aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans*/ *C. gattii* por medio de la técnica de tipificación de secuencias multi-locus MLST.

6.2 Material biológico

Aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans*/*C. gattii* disponibles en el cepario del grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, entre el período 2005-2014.

Aislamientos clínicos: los aislamientos clínicos se obtuvieron a través de la vigilancia pasiva de la criptococosis en Colombia.

Aislamientos ambientales: se obtuvieron del cepario ambiental disponible en el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

6.3 Áreas de Estudios

Este estudio se enmarca en el proyecto "Predicción de posibles áreas endémicas para *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* en Colombia: modelo ecológico de áreas en riesgo" a cargo del Grupo de investigación de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, cofinanciado por Colciencias (código: 2011-3600115683). Se estudiaron aislamientos clínicos y ambientales de la colección del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud del período 2005-2014, de los departamentos de Antioquia, Atlántico, Bogotá, Cauca, Norte de Santander y Valle. Esta selección se basó en la participación voluntaria de Grupos de investigación en el país (Tabla 1).

Tabla 1: *Descripción de áreas de estudio según sus características físicas y condiciones macro-ecológicas*

Departamento	Altura (msnm)	Precipitación	Temperatura promedio	Clima
Antioquia	1.479	1.656mm	23 ºC	Templado y húmedo, consta de variaciones de temperaturas, la época más seca y cálida se encuentra en los meses de diciembre-enero y junio-julio.
Atlántico	142	821mm	27 ºC	Tropical seco que con dos temporadas, la primera seca (diciembre-abril) y una estación de lluvia (abril- noviembre).
Bogotá, DC	2.630	1250mm	14 ºC	Templado subhúmedo con dos temporadas de lluvias (diciembre a marzo y de junio a septiembre) y dos temporadas secas (marzo-junio y septiembre - diciembre).
Cauca	1.760	1.941mm	18 ºC	Templado y cálido que varía a lo largo del año, siendo el mes de septiembre el más cálido y el mes de noviembre el más frio.
Norte de Santander	320	806mm	30 ºC	Tropical seco determinado por pisos térmicos que van del frío, pasando por el templado hasta llegar al cálido, la temporada de vientos ocurre entre junio y septiembre.
Valle	995	900mm	23 ºC	Sabana tropical que consta de dos estaciones: seca (diciembre-febrero y julio-agosto) y lluvia (marzo–mayo y septiembre-noviembre).

6.4 Objetivo específico Nº1:

Caracterizar los aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii por PCR huella digital y Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen URA5.

Fundamento: El empleo de las técnicas de PCR huella digital y RFLP del gen URA5 permitirá realizar la caracterización molecular inicial de los aislamientos del 2005-2014 con el propósito de seleccionar 97 aislamientos para ser genotipificados por MLST**.**

Para el cumplimiento de este objetivo, se inició con datos previos del Grupo de Microbiología relacionados con la tipificación de 621 aislamientos del periodo 2005-2012, de los cuales 493

aislamientos eran clínicos y 128 ambientales (Anexo 1); se procesaron por PCR huella digital y Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP); adicionalmente, un total de 442 aislamientos correspondientes al periodo 2013-2014, de los cuales 97 aislamientos eran clínicos y 345 ambientales; para un total de 1063 aislamientos tipificados por PCR huella digital y RFLP. La metodología seguida para tal fin se describe a continuación:

6.4.1 Extracción de ADN:

A los 442 aislamientos del periodo 2013-2014 almacenados a -70ºC en glicerol al 10%, se les realizó la extracción de ADN como antes se ha descrito por Casali, et al 2003 (157)**,** brevemente: los aislamientos de *C. neoformans* /C. *gattii*, se sembraron en agar extracto de levadura-peptona-dextrosa (YEPD) durante 48 horas a 27 ºC, posteriormente un asada de este cultivo se puso en un tubo eppendorf y se incubó a -20 ºC por una hora, a continuación se suspendió en 500µl de buffer de lisis (10 mM Tris, pH 7,5, EDTA 1 mM, pH 8,0 y 1% SDS) y se incubó a 65 ºC por una hora, posteriormente se adicionó 500µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), se centrifugó por 15 minutos a 13.000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadió un volumen igual de isopropanol, el ADN se precipitó a -20 ºC durante una hora, posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 4 °C a 13.000 rpm. El ADN se precipitó con etanol al 70% y se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 4 °C a 13.000 rpm, el ADN se secó a temperatura ambiente, las muestras se re-suspendierón en 50µl de TE y se almacenó a 4 ºC (158).

6.4.2 PCR Huella digital y Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP):

Se determinó el patrón molecular de *C. neoformans* y *C. gattii* por medio de PCR huella digital $(GTG)_5$ y RFLP del gen URA5 (26-29).

PCR huella digital $(GTG)_5$: se utilizó el iniciador de secuencia microsatélite $(GTG)_5$. Brevemente, las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 50 µl que contenía 31.5 µl de agua de PCR, 2.5 µl (10 ng/µl) de ADN, 5µl de buffer de PCR 10X, 0.5 µl dNTPs a 20Mm (20 mM de cada base: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), acetato de sodio (50 mM) 3µl, MgCl2 (1,5 mM) 2µl, iniciador 4µl a 10ng/µl, BSA 1µl y Taq 0.5µl Las condiciones de amplificación se describen a continuación (Tabla 2).

Tabla 2: *Condiciones de amplificación PCR huella digital con el iniciador $(GTG)_5$*

Condiciones de la PCR (35 ciclos)	
Desnaturalización	94 ºC durante 20 segundos
Anillamiento	50 ºC durante 1 minuto
Extensión	72 ºC durante 20 segundos
1 ciclo final de extensión	72 ºC durante 6 minutos

Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.4% en buffer 1X Tris-borato (TBE) a 80 V durante tres horas y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta para su posterior toma de la fotografía. Los productos de PCR se compararon con las cepas de referencia reportados por Meyer et al., 2009. Los patrones moleculares (VNI-VNIV y VGI-VGIV) se asignan por comparación de acuerdo a las bandas obtenidas de cada aislamiento (26, 29, 158).

Cepas Control:

- *C. neoformans* var. *grubbii* (WM 148), patrón molecular VNI
- *C. neoformans* var. *grubbii* (WM 626), patrón molecular VNII
- *C. neoformans* var. *grubbii* (WM 628), patrón molecular VNIII
- *C. neoformans* var. *neoformans* (WM 629), patrón molecular VNIV
- *C. gattii* (WM179), patrón molecular VGI.

- *C. gattii* (WM 178), patrón molecular VGII
- *C. gattii* (WM 161), patrón molecular VGIII
- *C. gattii* (WM 779), patrón molecular VGIV

RFLP del gen URA_5: amplificación y digestión del gen orotidin monofosfato pirofosforilasa empleando los iniciadores:

- URA5 (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG'3)
- SJ01 (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC'3)

La PCR del gen URA5 se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía: 31,5 µl de agua de PCR, 2 µl (50 ng/µl) de ADN, 5µl de buffer de PCR 10X, 0.5 µl dNTPs a 2 Mm (2 mM de cada base: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1.5µl, MgCl2 (1,5 mM) 2µl, de cada iniciador 5µl a 10ng/µl, BSA 1µl y Taq 0.3µl, la determinación del patrón molecular a partir de un fragmento de 779 pb correspondiente al gen URA5. Las condiciones de amplificación se describen a continuación: (Tabla 3).

Tabla 3: *Condiciones de amplificación, Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen URA5*

Condiciones PCR URA5 (35 ciclos)	
Desnaturalización inicial	91ºC durante 3 minutos
Desnaturalización	94ºC durante 45 segundos
Anillamiento	62ºC durante 1 minuto
Extensión	72ºC durante 2 minutos
1 ciclo final de extensión	72ºC durante 10 minutos

Los productos se analizaron por electroforesis con geles de agarosa al 1.4% en 1X Tris-borato (TBE) a 100 V durante una hora y se visualizaran en un transiluminador de luz ultravioleta para la posterior toma de la fotografía. Para la restricción de los productos de PCR se tomaron 30µl de

producto de PCR y se digirieron con las enzimas de restricción *HhaI* y *Sau*96 a 37 °C durante la noche y se separaron por electroforesis en geles al 2.0% en buffer 1X Tris-borato (TBE) a 80 V durante 2.5 horas. Los patrones de RFLP fueron asignados mediante comparación con los tipos moleculares (VNI-VNIV y VGI-VGIV) visualmente, los controles empleados son los mismo descrito en la sección anterior de PCR Huella Digital. (27-28).

6.5 Objetivo específico Nº 2:

Determinar el genotipo en un grupo de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii mediante Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST) de 7 loci.

Fundamento: La técnica de MLST permite realizar una tipificación robusta de los aislamientos de C. neoformans y C. gattii permite identificar la presencia de posibles clones en los dos grupos de aislamientos estudiados (clínico y ambiental).

Tipificación de secuencias multilocus (MLST): inicialmente se realizó la estandarización de la PCR para cada uno de los siete genes de expresión constitutiva, teniendo en cuenta las condiciones descritas por Meyer W, et al, 2009 (31); estos incluyen los genes CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 y la región inter espaciadora IGS1 (Tabla 4).

Tabla 4: Nomenclatura *y peso molecular de genes consensos multi-locus.*

Gen		Peso molecular (pb)
CAP59	Capsular	630
GPD1	Gliceraldehido	543
LAC1.	Síntesis de melanina	600
PLB1	Fosfolipasa	700
SOD1.	Superoxido dismutasa	700
URA_5	Ureasa	700
IGS1	Región inter espaciadora	723

Para realizar la estandarización se manejó un volumen final de 20µl y un volumen de 2µl de ADN a una concentración de 1ng/µl para los genes *CAP59, SOD1, IGS1* y *GPD1* y un volumen de 5µl de ADN a una concentración de 5ng/µl para los genes *LAC1, PLB1* y URA_5 (Tabla 5, Anexo 4). Los genes *LAC1* y *SOD1,* se estandarizaron de forma diferente con respecto a los demás genes, debido a que la secuencia de estos genes discrimina tanto para *C. neoformans* y *C.gattii*, se realizó una estandarización para *LAC1*, *C. gattii* y otra para *LAC1*, *C. neoformans*, lo mismo sucede con el gen *SOD1* .

Tabla 5: *Condiciones de reactivos* y concentraciones por reacción *empleados para la tipificación de secuencias multilocus (MLST) de C. neoformans y C. gattii*

	CAP59, SOD1, IGS1 y GPD1		***LAC1* y *PLB1***		***URA_5***	
Reactivo	**Volumen por reacción**	**Concentración Final**	**Volumen por reacción**	**Concentración final**	**Volumen por reacción**	**Concentración final**
Buffer	2 µl	1X	2 µl	1X	2 µl	1X
$MgCl_2$	0,8 µl	1Mm	0,8 µl	1Mm	1,8 µl	4.5 mM
NaAC	1,7 µl	4,25M	1,7 µl	4,25M		
dntp's	0,2 µl	0,2mM/µl	0,2 µl	0,2mM/µl	0,2 µl	0,2mM/µl
Iniciador	1,2 µl	0,6 mM/µl	2 µl	1 mM/µl	2 µl	1 mM/µl
Iniciador	1,2 µl	0.6 mM/µl	2 µl	1 mM/µl	2 µl	1 mM/µl
Taq	0.25 µl	0.06U	0.25 µl	0.06U	0.12 µl	0.06U
Total	7,35 µl*		8,9 µl**		8,1 µl***	

El volumen final de agua de PCR es de 10,65 µl*, 9,1 µl ** y 6,9 µl***

Una vez estandarizadas cada una de las PCR para los 7 genes, se seleccionaron 97 aislamientos por conveniencia; 48 aislamientos de origen clínico y 49 aislamientos de origen ambiental, a los cuales se les realizó MLST; los criterios de selección se basaron en la representatividad de los patrones moleculares obtenidos por PCR huella digital - RFLP y de las 6 regiones incluidas en el estudio; la cantidad de aislamientos seleccionados fue sujeta a costos de la técnica.

Análisis de resultados: los productos de PCR fueron secuenciados por Macrogen con el secuenciador 23 ABI 3730 XLs., las secuencias se analizaron en el Sofware Sequencher 5.2 y

posteriormente se realizó un análisis filogenético basado en el análisis de máxima verosimilitud con el programa Mega versión 5.0. Los resultados obtenidos fueron confrontados con la base de datos disponible para el complejo (http://c*neoformans*.mlst.net/).

Adicionalmente se incluyeron en este estudio aislamientos clínicos de *C. gattii* que ya contaban con la secuencia reportada por Lizarazo J, et al. en el 2014 (153).

6.6 Objetivo específico Nº 3

Estudiar los principales factores de virulencia por cada secuencia tipo identificada de C. neoformans y C. gattii.

Fundamento: se exploraran las relaciones entre genotipo y fenotipo in vitro, entre aislamientos clínicos y ambientales, con el fin de relacionar las secuencias tipo con la virulencia criptocócica,

Por cada secuencia tipo obtenida se seleccionó al azar uno o dos aislamientos dependiendo de si provenía de una misma fuente (clínico o ambiental), o si se tenía una misma ST de origen clínico y ambiental. Para cumplir con este objetivo se realizaron seis diferentes pruebas de virulencia y un experimento en un modelo animal *"Galleria mellonella"* que determinan la patogenicidad de las cepas, estas pruebas se describen a continuación:

6.6.1 Crecimiento a 37 ºC

Cada aislamiento referente a cada secuencia tipo se sembró en cajas de agar glucosado de Sabouraud por 48 horas a 27 °C, Para esta metodología se partió de un inóculo a $1.5X10^7$ UFC/ml, el cual se ajustó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm y una lectura de 0.272 de absorbancia, posteriormente se realizó una dilución de 1:1000 y se sembró 100µl del inóculo en agar glucosado de Sabouraud por 48 horas a 37 °C. La interpretación se realizó evaluando el crecimiento o la ausencia de crecimiento de los aislamientos, se empleó un

control positivo (*C. unigotulatus* código INS: H0058-3-1) y un control negativo (*C. albicans* código INS: 18804) (158).

6.6.2 Tamaño capsular y celular

Cada aislamiento referente a cada secuencia tipo se sembró en cajas de agar glucosado de Sabouraud por 48 horas a 27 °C, al culminar este tiempo se sembró una asada de cada cultivo en 10 ml de caldo Sabouraud y se incubo a 30 °C por 48 horas a 150 rpm, posteriormente se preparó una lámina que contenía una gota de tinta china y una gota de cada tubo, a continuación cada lámina se visualizó en un Microscopio Zeizz Axiophot en un lente de 40X, por cada aislamiento se midieron 20 células, se midió el área total de la célula y el área de la capsula, se calculó el área celular según el área total menos el área de la capsula. Se emplearon cinco controles (C. gattii B-3506 (H0058-I-1320) presenta tamaño capsular bajo, C. neoformans var. grubii (H0058-I-580) presenta capsula grande alto, C. neoformans var. grubii (H0058-I-548) tamaño capsular medio, C. neoformans (H0058-I-737) tamaño celular medio y C. gattii (H0058-I-755) tamaño celular bajo (5, 96-97, 158).

6.6.3. Fenotipo de las colonias

Cada aislamiento referente a cada secuencia tipo se sembró en cajas de agar glucosado de Sabouraud por 48 horas a 27 °C, para esta metodología se partió de un inóculo a $3.0X10^7$ UFC/ml, el cual se ajustó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530nm y una lectura de 0.561 de absorbancia, posteriormente se realizó una dilución de 1:1000 y se sembró 100µl del inoculo en agar glucosado de Sabouraud a 27 °C y se realizó seguimiento a 20 colonias seleccionadas al azar por 7 días, tiempo en el cual se midió diariamente el tamaño de cada colonia y se observaron las características morfológicas. Se determinó la morfología de la colonia

por visualización macroscópica de acuerdo a la textura (lisa o mucoide) y aspecto del margen y de la superficie de la colonia (ondulado, liso o irregular), se emplearon tres controles que presentaban las diferentes morfologías *C. neoformans* var. *grubbii* (H0058-I-1580) colonias que presentan texturas no mucoide, superficie y borde rugosa, *C. neoformans* var. *grubii* (H0058-I-5518), *C. gattii* (H0058-I-1320) colonias que presentan texturas mucoide, superficie y borde lisa (158).

6.6.4. Determinación de la frecuencia del switching fenotípico

Cada aislamiento referente a cada secuencia tipo se sembró en cajas de agar glucosado de Sabouraud por 48 horas a 27 °C, al culminar este tiempo se realizó un inoculo a 3.0X107 UFC/ml, el cual se ajustó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530nm y una lectura de 0.561 de absorbancia, posteriormente se realizó una dilución de 1:1000 y se sembró 100µl del inoculo en agar glucosado de Sabouraud a 27 °C por 48 horas, por cada cepa se realizaron 100 réplicas en cajas agar glucosado de Sabouraud para determinar el fenómeno de switching. Se realizó la observación de cada una de las colonias para observar un posible cambio de acuerdo a la textura (lisa o mucoide). Para el cálculo de la frecuencia del fenómeno, se determinó el porcentaje de colonias con variaciones morfológicas, con respecto al tipo de colonia frecuente al observar las 100 cajas, se empleó un control positivo *C. neoformans* var. *neoformans* (H0058-I-1311) que presentaba cambio respecto al tipo de la colonia (158-160).

6.6.5. Determinación de la pareja sexual a ó α

Cada aislamiento referente a cada secuencia tipo se sembró en cajas de agar YEPD por 48 horas a 27 °C, al culminar este tiempo se realizó la extracción de ADN antes mencionada en el objetivo N°1, posteriormente se realizó una PCR de acuerdo con las condiciones descritas por Hallyday et

al (161). Para la PCR se emplearon los iniciadores MFα que codifican para una feromona específica para la pareja sexual α y los MFa2 que codifican para una proteína cinasa específica para la pareja sexual a (162).

Condiciones de reactivos y de amplificación de PCR de pareja sexual "a" y "alfa".

La PCR pareja sexual a se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía: 37 µl de agua de PCR, 2 µl (10 ng/µl) de ADN, 5µl de buffer de PCR 10X, 5 µl dNTPs a 2 Mm (2 mM de cada base: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1.5µl, MgCl2 (1,5 mM) 2µl, de cada iniciador 5µl a 10ng/µl, y Taq 0.5µl, la determinación del patrón molecular a partir de un fragmento de 120 pb. Las condiciones de amplificación se describen a continuación: (Tabla 5).

La PCR pareja sexual α se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía: 30.72 µl de agua de PCR, 2 µl (10 ng/µl) de ADN, 5µl de buffer de PCR 10X, 5 µl dNTPs a 2 Mm (2 mM de cada base: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 3µl, MgCl2 (1,5 mM) 2µl, de cada iniciador 1,2µl a 10ng/µl de MfαU y 1.58µl a 10ng/µl de MfαL, y Taq 0.5µl, la determinación del peso molecular a partir de un fragmento de 240 pb. Las condiciones de amplificación se describen a continuación: (Tabla 6).

Tabla 6: *Condiciones de amplificación, PCR sexual "alfa" y "a"*

Condiciones PCR (30 ciclos)	
Desnaturalización inicial	94ºC durante 5 minutos
Desnaturalización	94ºC durante 1 minuto
Anillamiento	55ºC durante 1 minuto
Extensión	72ºC durante 1 minuto
1 ciclo final de extensión	72ºC durante 7 minutos

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,2% en buffer 1X (TBE) a 100 V durante 1 hora. La interpretación se realizó por la amplificación de una banda a la altura de 109 pb que corresponde a la pareja sexual α y una banda de 140 pb que corresponde a la pareja sexual

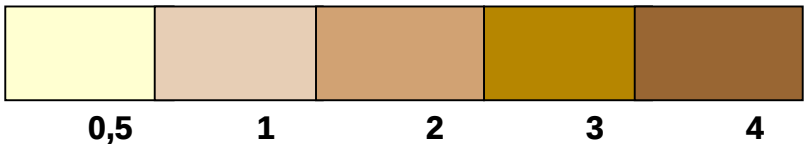
a, se implementaron cepas control JEC20 (C. *neoformans* var. *neoformans*) para pareja sexual a y JEC21 (C. *neoformans* var. *neoformans*) para pareja sexual α (156, 158).

6.6.6. Determinación de las actividades enzimáticas

Cada aislamiento referente a cada secuencia tipo se sembró en cajas de agar glucosado de Sabouraud por 48 horas a 27 °C, al culminar este tiempo se realizó evaluación enzimática para la fenoloxidasa, proteasa y fosfolipasa de la siguiente manera:

Fenol-oxidasa: Para esta metodología se partió de un inóculo a $1.5X10^7$ UFC/ml, se ajustó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530nm a una lectura de 0.272 de absorbancia, posteriormente se realizó una dilución de 1:1000 y se sembró en forma de gota en agar semilla guizonttia por triplicado para cada aislamiento, se incubó a 27 °C y se realizaron observaciones diarias por 24 días para determinar la melanización de la colonia, la escala empleada consta de cinco mediciones según la intensidad de la melanización (figura 1).

Figura 1: *Escala de medición de la actividad de la enzima fenoloxidasa*



Se emplearon tres controles *C. neoformans* var *grubii* (H0058-I-581) actividad baja, *C. gattii* (H0058-I-755) actividad alta y *C. neoformans* var. *grubbii* (H0058-I- 2257) actividad baja (158).

Proteasa: Para esta metodología se partió de un inóculo a $3.0X10^7$ UFC/ml, se ajustó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530nm a una lectura de 0.561 de absorbancia, posteriormente se realizó una dilución de 1:1000 y se sembró 10µl del inoculo en agar base carbón levadura (YCB) suplementado con albúmina bovina sérica más polipeptona (BSA +PP) a 27 °C por 10 días, posteriormente se realizó la visualización de las zonas de proteolisis mediante

la adición de ácido tricoloroacético al 10% y azul de Coomasie, la interpretación de la actividad proteolítica extracelular es dada por un valor PZ= A/B, donde A corresponde al diámetro de la célula y B corresponde al diámetro de la célula más la capsula,. El rango de la actividad está catalogado como negativa (PZ=1), bajo (PZ=0.7-0.99), medio (PZ=0.5-0.69) y alto (PZ=<0.5) se realizó según los valores PZ. Se emplearon dos controles *C. neoformans* var. *grubbii* (H0058-I-743) actividad media y *C. neoformans* var *grubbii* (H0058-I-860) actividad baja (158).

Fosfolipasa: Para esta metodología se partió de un inóculo a $3.0X10^7$ UFC/ml, se ajustó con un espectrofotómetro a 530nm a una lectura de 0.561 de absorbancia, posteriormente se realizó una dilución de 1:1000 y se sembró 10µl del inoculo en cajas de agar glucosado de Sabouraud suplementado con yema de huevo a 27 °C por 10 días, posteriormente se realizó la visualización de las zonas de hidrólisis que indican actividad de la fosfolipasas. La interpretación de la actividad de la fosfolipasa extracelular es dada por un valor PZ, calculado y medido dentro de un rango igual al de la prueba de detección de actividad proteolítica extracelular. Se emplearon dos controles *C. neoformans* var. *grubbii* (H0058-I-550) actividad baja y *C. neoformans* var. *grubbii* (H0058-I-755) actividad alta, la interpretación se realizó según los valores PZ (Tabla 8) (158).

6.6.7. Modelo Invertebrado "*Galleria mellonella"*

Se empleó para la determinación el nivel de virulencia de las secuencia tipo por medio de un modelo invertebrado, se emplearon cepas control de alta virulencia (H99, *C. neoformans* var. *grubbii*) y baja (JEC20, *C. neoformans* var. *neoformans*, pareja sexual a) con el fin de comparar la mortalidad en el diseño animal. Las larvas se obtuvieron de un zoocriadero en la ciudad de Cali, estas se seleccionaron según sus características macroscópicas no debían presentar ninguna coloracion en la cutícula, ya que pueden indicar larvas infectadas por hongos u otros

microorganismos, además se escogieron larvas de últimos estadios (quinto y sexto) con un tamaño entre 250 a 330 mg y una longitud de aproximadamente 2 cm.

Preparación del inóculo: cada aislamiento se sembró en cajas de agar glucosado de Sabouraud por 48 horas a 27 °C, al culminar este tiempo se realizó un inoculo ajustado a $1.5X10^8$ por cámara de Neubauer, posteriormente se realizaron dos diluciones ($1:10^5$ y $1:10^3$) para obtener una concentración de $1,5x10^3$ UFC/ml; de esa concentración se sembró 100µl en agar Sabouraud y se incubo a 30 °C, con el fin de verificar la concentración del inoculo (118).

Inoculación de las larvas: se inocularon 20 larvas por cada cepa; las larvas seleccionadas se inocularon con 10 µl de una suspensión de levadura a $1.5X10^8$, mediante una inyección en ela última pro-pierna izquierda usando una jeringa de insulina de 50U de calibre 29. Después de la inyección, las larvas se incubaron en cajas de Petri a 37 °C y el número de larvas muertas se describió diariamente.

Un grupo de 60 larvas se implementaron como control absoluto, control de desinfección y control de inoculación 20 ejemplares para cada control; el primer control de larvas no tienen ninguna manipulación (para controlar la calidad de las larvas), el segundo grupo control de larvas únicamente son desinfectadas (para controlar microorganismos) y el tercer grupo control de larvas se inoculó con PBS 1X y fueron desinfectadas (para controlar algún tipo de daño locomotor causado por la inoculación) (118).

Tamaño celular y capsular de C. neoformans y C. gattii después de la inoculación

Las células de todas las cepas fueron aisladas de las larvas de *G. mellonella* después de la inoculación, para evaluar la producción de la cápsula y el crecimiento celular in vivo. Cada larva muerta se maceró y se homogenizó en 1 ml de PBS 1X. Los homogeneizados se sembraron en caldo Sabouraud dextrosa a 30 °C por 48 horas a 150 rpm, posteriormente se preparó una lámina

que contenía una gota de tinta china y una gota de cada tubo, a continuación cada lámina se visualizó en un Microscopio Zeizz Axiophot en un lente de 40X. Por cada aislamiento se midieron 20 células, se midió el área total de la célula y el área de la capsula. El análisis se realizó como se describió previamente en el objetivo tres, sección: tamaño capsular y celular (5, 96-97, 158).

Análisis de resultados: la recolección de los datos de virulencia se tabuló en el programa Excel ® Microsoft Corporation; el análisis se realizó con el programa estadístico Spss versión 11.0, para las variables numéricas se desarrolló por medio de medidas de tendencia central y para las variables categóricas se empleó el test Chi cuadrado o test exacto de Fisher, con una significancia menor de 0.05% y 95% de confianza. Se realizó el análisis de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier para el modelo invertebrado "*Galleria mellonella"*, el análisis del efecto de cambio capsular y celular pre y pos-inoculación se realizó mediante el estadístico de McNema generado con un 95% de confianza

6.7 Objetivo específico Nº4

Determinar si existe una diferencia en la distribución geográfica entre las especies de C. neoformans y C. gattii, y sus secuencias tipo mediante el uso del Modelo de Nicho Ecológico.

Fundamento: La creación del Modelo de Nicho Ecológico permitirá predecir aquellas posibles áreas endémicas para la criptococosis e identificar las zonas que actualmente albergan el hongo.

6.7.1 Sistemas de información geográfica, macro-ecológica y software de modelamiento

Se empleó el programa computacional ArcGIS 9.1 (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA, USA) para llevar a cabo el mapeo del sistema de información geográfica (SIG). Los datos macro-ecológicos (variables ambientales como temperatura, humedad relativa,

presipitacion y brillo solar) se obtuvieron del observatorio nacional de Instituto Nacional de Salud, suministrados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) (146), la información topológica se obtuvo de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura "FAO" (elevación, aspecto, pendiente, tipo de suelo y cubierta terrestre) (147). Se empleó el algoritmo GARP 1.1.6 para realizar el Modelo de Nicho Ecológico de *C. neoformans* y *C. gattii* en Colombia.

6.7.2 Casos clínicos y datos ambientales

Se utilizaron casos clínicos y datos ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* como datos de entrada para la elaboración del modelo de nicho ecológico. Los casos clínicos se obtuvieron de la información clínica y epidemiológica reportada a través de la encuesta nacional para la criptococosis en Colombia entre el período 1987-2014 de todos los departamentos. Los casos ambientales se obtuvieron de la información ambiental disponible en el grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud entre el período 1987-2014.

Con el fin de alimentar el modelo se incluyeron todas las ciudades muestreadas ambientalmente desde el periodo 1987-2014, la recopilación de los datos ambientales fue de las ciudades de Leticia, Barranquilla, Bogotá, Sogamoso, Cali, Choco, Nariño, Medellín, Montería, Pereira, Popayán, Cúcuta y Bucaramanga; el material vegetal provenía de varias especies de árboles y el material biológico provenía de varias especies de aves (Anexo 2 y 3).

Ubicación de casos humanos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii*: para la ubicación de los casos clínicos, se incluyeron datos de ubicación geográfica de aquellas encuestas que presentaban la dirección del domicilio del paciente, la cual fue suministrada por el paciente por voluntad propia al diligenciar la encuesta el profesional de salud, estos datos se emplearon como puntos de entrada al modelo, la ubicación del lugar de residencia no presenta definitivamente la exposición

y la presencia de *C. neoformans* y *C. gattii*, pero en su lugar presenta sustitutos de donde probablemente pudo ocurrir la exposición. Los puntos de entrada ambientales del periodo 1897-2014 se tomaron de la base de datos ambiental del grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

6.7.3 Capas de datos clínicas y ambientales

Se utilizaron 38 capas de datos ambientales (variables ambientales, topológicas y geográficas) que se consideraron influyentes para la elaboración del modelo de nicho ecológico. Los datos macro-ecológicos se obtuvieron del IDEAM (temperatura, precipitación, brillo solar y humedad relativa), la información topológica se obtuvo de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura "FAO" (elevación, aspecto, pendiente, tipo de suelo y cubierta terrestre) (147).

6.7.4 Modelado GARP para *C. neoformans* y *C. gattii*

Para la creación del modelo se emplearon casos clínicos y muestras ambientales positivas, en modelos separados para *C. neoformans* ambiental, *C. neoformans* clínico y un modelo unificado para *C. gattii* clínico y ambiental; este agrupamiento fue debido al número limitado de casos clínicos reportados. GARP, programa empleado para la creación del modelo de nicho ecológico, utiliza diferentes tipos de datos y reglas en el proceso de creación del modelo (atómicas, alcance, alcance negativo y regresión logística). Las variables macro-ecológicas, y el conjunto de datos topológicos son datos nominales. El conjunto de los datos de precipitación, elevación, temperatura, vegetación y cobertura son variables de razón (18).

6.7.5 Datos utilizados para la validación de los modelos

Los modelos se validaron con casos y muestras colombianas, ya que nuestro país cuenta con unas características particulares en su clima y cada región y/o departamento cuanta con la particularidad ambiental, los modelos clínicos se validaron con muestras ambientales de la misma posición georreferencial y viceversa.

6.7.6 Capa jackknifing de datos Ambientales

GARP identifica qué factores ambientales son más significativos o importantes que otros para predecir el nicho ecológico de una especie; esta capa es llamada jackknifing o capa del medio ambiente, implica la ejecución de múltiples tareas con combinaciones en el modelo de nicho ecológico con sólo un subconjunto de las capas (18), comprueba que las capas de datos ambientales impactan positivamente al rendimiento del modelo. El modelo utiliza los valores de los errores de omisión y comisión, lo cual busca identificar los errores más pequeños, así mismo los valores más altos de precisión y exactitud.

Para el modelo *C. neoformans* clínico, *C. neoformans* ambiental y el modelo en conjunto clínico y ambiental de *C. gattii* los datos se dividieron en formación (50%) y prueba (50%) de un subconjunto de datos para cada modelo. Las 38 capas de datos ambientales fueron analizados individualmente a través de 100 ensayos respectivamente. Cada ensayo del modelo consistió en un máximo de 1000 interacciones o hasta que se alcanza el límite de convergencia de 0,01.

6.7.7 Modelado GARP con capas de datos ambientales influyentes

Para cada modelo de nicho ecológico (*C. neoformans* clínico, *C. neoformans* ambiental y *C. gattii* clínico-ambiental), se realizó un modelo final utilizando las capas de datos ambientales que

tienen un impacto positivo identificadas por el procedimiento de Jackknifing; se realizaron 30 ensayos para *C. neoformans* clínico, *C. neoformans* ambiental y *C. gattii* clínico-ambiental respectivamente. Cada modelo consistio hasta de 1000 interacciones o hasta alcanzar el modelo más parsimonioso, los ensayos se crearon con una precisión >80%; los valores de cada celda indican: "1" condiciones ambientales óptimas en la que el hongo se encuentra presente o puede llegar a presentarse y "0" indica la ausencia del hongo (18).

6.7.8 Georreferenciación de las secuencias tipo de seis departamentos

Para cada modelo de nicho ecológico, se realizó la georreferenciación de las secuencias tipo con el fin de observar la distribución y su influencia ambiental.

7. Resultados y Discusión

7.1 Objetivo específico Nº1:

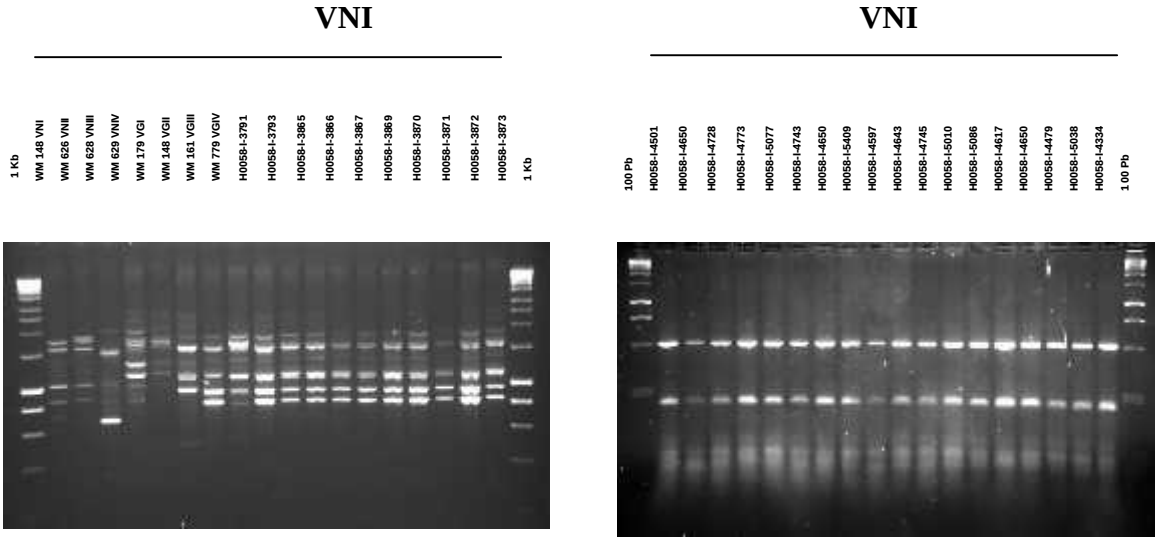
Determinar el perfil molecular de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii por PCR huella digital y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen URA5.

De un total de 1063 aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii*, 590 aislamientos fueron recuperados a través de la vigilancia nacional para la criptococosis y 473 fueron recuperados del ambiente en seis departamentos entre los periodos 2005-2014 (Tabla 7). Para *C. neoformans* los aislamientos clínicos y ambientales se relacionaron en un 88.1% en el patrón molecular VNI y en menor proporción VNII con un 3.7%, para *C. gattii* los aislamientos clínicos y ambientales se relacionaron en un 4.3%, con el patrón molecular VGII, seguido de VGIII en un 3.3% y en menor proporción VGI en un 0.6%. Los patrones moleculares VNIII, VNIV y VGIV no se aislaron en este periodo s de muestras clínicas y ambientales, las dos técnicas moleculares presentaron un 100% de consistencia entre los resultados obtenidos (Figura 2).

Tabla 7. *Patrón molecular de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii 2005-2014.*

		Antioquia	Atlántico	Bogotá	Cauca	Norte de Santander	Valle	**Total (%)**
Clínico	VNI	130	26	147	13	36	184	536 (90.9)
	VNII	5		9	1	4	14	33 (5.5)
	VGI	2	1	2				5 (0.9)
	VGII	1		1	1	8	1	12 (2)
	VGIII			1		1	2	4 (0.7)
Total		138	27	160	15	49	201	590 (100)
Ambiental	VNI	19	9	37	303	17	16	401 (84.8)
	VNII			1	4	1		6 (1.3)
	VGI			1				1 (0.2)
	VGII			31		2		33 (6.9)
	VGIII			21	1	10		32 (6.8)
Total		19	9	91	308	30	16	473 (100)

Figura 2: *Caracterización de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii por PCR huella digital GTG5 (A) y RFLP-URA5 (B).*



(A) (B)

C. neoformans var. *grubii* patrón molecular VNI, fue identificado en todos los departamentos en casos clínicos y cepas ambientales, resultados similares a los observados en países como Vietnam, India, Malasia, China, Corea, Egipto, Brasil, Australia, entre otros (24-25, 32, 27 , 163). La criptococosis en Colombia por *C. neoformans* var. *grubbii* patrón molecular VNI, refleja una incidencia de 95,6% de los casos notificados y presenta una alta morbilidad y mortalidad, especialmente en los pacientes con VIH, aunque existen otros factores de riesgo como leucemia, insuficiencia renal y diabetes.

Por su parte el agente etiológico *C. gattii* afecta en un del 90% de las veces a individuos aparentemente inmunocompetentes; la incidencia de criptococosis por *C. gattii* en Colombia es baja en un 3,7% con relación a lo reportado en diferente partes del mundo, como Canadá que para el periodo 2002-2005 reporto una incidencia *C. gattii* en la isla de 37 casos/millón de habitantes/año, la más alta informada mundialmente (17). Sin embargo, el departamento de Norte de Santander tiene una alta prevalencia en un 33,3%, similar a la reportada en países con alta

prevalencia como el Norte de Australia, Brasil, Canadá y Papúa Nueva Guinea, estos estudios se relacionan al reporta con mayor frecuencia el patrón molecular VGII en muestras clínicas como sucede en Colombia (3, 25, 76, 121, 164- 165).

En el ambiente *C. neoformans* var *grubii* patrón molecular VNI se distribuye en todo el mundo en países como Brasil, Argentina, India, entre otros, se recupera con mayor frecuencia en excremento de aves y por lo general en la paloma común (*Columba livia*), aunque en los últimos años se ha aislado de fuentes ambientales, aumentado los informes de la presencia de este hongo en árboles como *Terminalia catappa, Acacias, Guayacán* entre otros (25, 166- 168)**.**

C. gattii se ha recupera de diferentes especies nativas de árboles como *Alnus spp, Cedrus spp, seudotsuga menziesii, Quercus garryana* y *Abies grandis* (22, 25). Sin embargo, es común recuperar *C. gattii* de especies como *Eucaliptus sp*, *Terminalia catappa*, reportado en los últimos años en Alemania, Austria, Italia, España, Países Bajos, Japón, Corea del Sur, India y Colombia; con mayor frecuencia es aislado el patrón molecular VGII seguido de VGIII (25, 69-70, 169).

Los resultados muestran que el patrón molecular más común en el ambiente es el más común en casos clínicos en un 84.7% y 90.8%, respectivamente, para *C. neoformans*, lo cual sugiere una posible relación de aislamientos de origen clínico y ambiental. Adicionalmente se observó una relación en proporciones similares entre los patrones encontrados en el ambiente y en lo reportados en casos clínicos. La presencia de este hongo en material vegetal y excremento de aves puede estar favorecida por las condiciones biológicas y físicas del ambiente; en los últimos años los reportes de la presencia de *C. neoformans* y *C. gattii* en diferentes géneros de árboles y en excremento de diferentes especies de aves, sugiere que existe una amplia variedad de nichos ecológicos inexplorados. La búsqueda constante de la distribución clínica y del ambiente es importante para entender la epidemiología, la ecología y la etiología de este patógeno.

7.2 Objetivo específico Nº 2:

Determinar el genotipo en un grupo de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii mediante Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST) de 7 loci.

A partir de los cinco diferentes patrones moleculares obtenidos por PCR Huella Digital y RFLP se seleccionaron 97 aislamientos de los cuales 48 aislamientos fueron clínicos: 46 aislamientos *C. neoformans* y dos *C. gattii*, adicionalmente se incluyeron 12 aislamientos clínicos de *C. gattii* que ya contaban con la secuencia tipo realizado por Lizarazo et al en el 2014 (153) (Anexo 5).

De un total de 60 aislamientos clínicos el 76.7% correspondían al sexo masculino, el promedio de la edad fue 42 años con valores mínimos de 18 años y máximos de 82 años de edad, el síntoma más común fue dolor de cabeza en un 73.3%, seguido de fiebre en un 53,3% y nauseas en un 51.6%, en menor proporción confusión, alteración visual, tos y pérdida de peso, el 71.6% de los casos presentaban algún factor de riesgo, siendo el más común VIH/SIDA+ con un 65% de los casos, de los cuales el 16.6% definió SIDA al momento de diagnosticarles la criptococosis; el 88.3% eran casos nuevos y el 11.2% eran casos que presentaron recaída en un tiempo menor a 6 meses, el 23.3% de los pacientes fallecieron (Tabla 8).

Se seleccionaron 49 aislamientos ambientales de los cuales 41 fueron *C. neoformans* y ocho *C. gattii*, el 73,5 % provenía de 10 diferentes géneros de árbol y el 26,5% restante provenía de excremento de *Columba livia* (Tabla 9).

En total se genotipificaron por MLST 109 aislamientos, clínicos (n=60) y ambientales (n=49), y se identificaron 20 secuencias tipos (ST) diferentes. Para *C. neoformans* se identificaron 12 ST entre las cepas de VNI y una ST entre las cepas de VNII; para *C. gattii* se identificaron tres ST entre las cepas de VGII y dos ST para VGI – VGIII. La relación genética de los aislamientos estudiados se muestra en las Figura 3, para *C. neoformans,* y la Figura 4 para *C. gattii*, mientras que la distribución de los ST por departamento se muestra en las Figuras 10 y 11.

Tabla 8: *Manifestaciones clínicas, factores de riesgo y condición de egreso de casos de Criptococosis asociados a aislamientos tipificados mediante MLST*

	C. neoformans		*C. gattii*		**Total**
Características	**n=46**	**%**	**n=14**	**%**	
Sexo					
Masculino	36	78,3	10	21,7	46
Femenino	10	21,7	4	8,7	14
Signos clínicos					
Dolor de cabeza	32	69,6	12	26,1	44
Fiebre	26	56,5	6	13,0	32
Náuseas y vomito	26	56,5	5	10,9	31
Confusión	16	34,8	6	13,0	22
Signos meníngeos	10	21,7	3	6,5	13
Alteración visual	8	17,4	3	6,5	11
Convulsión	6	13,0	2	4,3	8
Tos	7	15,2	1	2,2	8
Pérdida de peso	8	17,4	2	4,3	10
Factores de Riesgo *					
VIH/SIDA+	36	78,3	3	6,5	39
Síndrome de Evans	1	2,2			1
Lupus	2	4,3			2
Artritis			1	2,2	1
Condición					
Vivo	34	73,9	12	26,1	46
Muerto	12	26,1	2	4,3	14

**17 casos clínicos no presentaron un tipo de riesgo*

Tabla 9. *Aislamientos ambientales de C. neoformans y C. gattii por genero de árbol y especie animal.*

Especie	***C. neoformans***	***C. gattii***	**Total (%)**
Acacia	2		2 (4,1)
Corymbia	2	1	3 (6,1)
Eucalyptus	7	4	11 (22,4)
Guaiacum	1		1 (2)
Oiti	2	3	5 (10,2)
Palmera Real	1		1 (2)
Pinus	1		1 (2)
Pithecellobium	1		1 (2)
Roble	3		3 (6,1)
Terminalia catappa	8		8 (16,3)
Culumba livia	13		13 (26,5)
Total	41	8	49 (100)

En los 87 aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* se identificaron 13 secuencias tipo diferentes, la más frecuente fue ST93 con un 42.5%, seguido del ST23 en un 14%, ST77 con el 13%, ST2 en un 6.8% y en menor proporción se identificaron los ST5, ST6, ST15, ST40, ST56, ST63, ST69, ST71 y ST226. De los 22 aislamientos de *C. gattii* se identificaron 7 secuencias tipo; la más frecuente fue ST25 en un 36%, seguido del ST79 con un 27% y en menor proporción se identificaron los ST51, ST58, ST75, ST323 y ST324 (Tabla 13, Anexo 6).

Tabla 10. *Secuencias tipo de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii*

				Secuencias tipo alélicas							
Especie	**N° de aislamientos**	**Clínico**	**Ambiental**	***CAP59***	***GPD1***	***IGS1***	***LAC1***	***PLB1***	***SOD1***	***URA5***	**ST**
C. neoformans	6	6	0	7	1	1	1	1	1	2	2
	5	5	0	1	3	1	5	2	1	1	5
	1	1	0	1	1	1	3	2	1	5	6
	2	0	2	1	2	6	3	2	1	1	15
	13	0	13	7	1	1	2	1	1	2	23
	2	2	0	2	9	14	8	11	12	4	40
	1	0	1	1	1	1	2	1	1	2	56
	1	1	0	7	1	1	18	1	1	1	63
	5	5	0	7	5	1	3	3	1	1	69
	1	1	0	7	5	1	3	4	1	1	71
	12	1	11	1	1	25	3	2	1	1	77
	37	24	13	1	23	10	3	4	1	1	93
	1	0	1	7	3	1	5	2	1	1	226
Total	**87**										
C. gattii	8	7	1	2	6	25	4	18	12	10	25
	2	2	0	16	5	3	5	5	32	12	51
	2	2	0	16	11	13	19	15	34	14	58
	2	0	2	18	3	1	3	6	40	19	75
	6	1	5	29	7	5	2	4	28	21	79
	1	1	0	2	6	95	4	18	12	10	323
	1	1	0	2	21	25	4	41	12	2	324
Total	**22**										

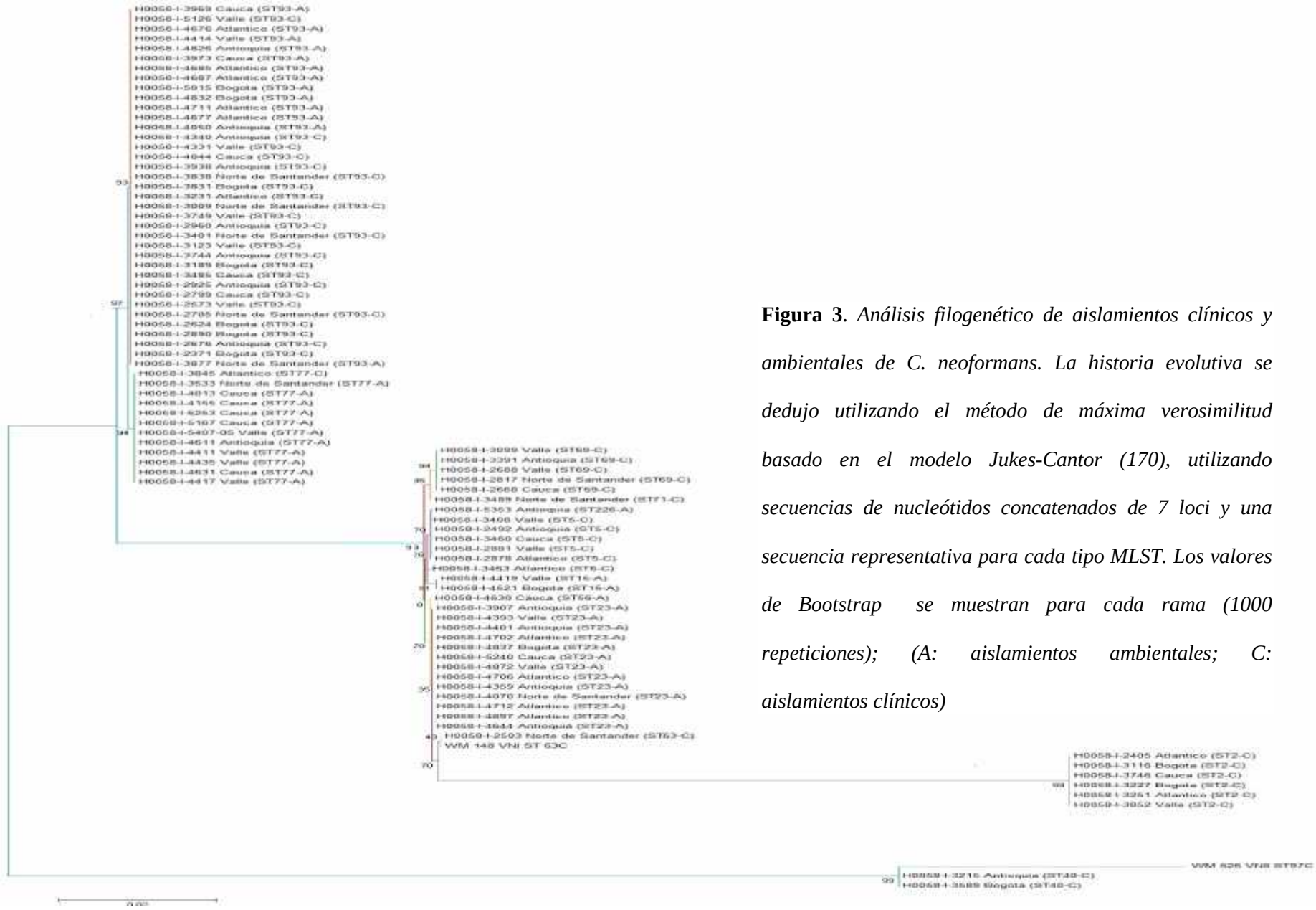
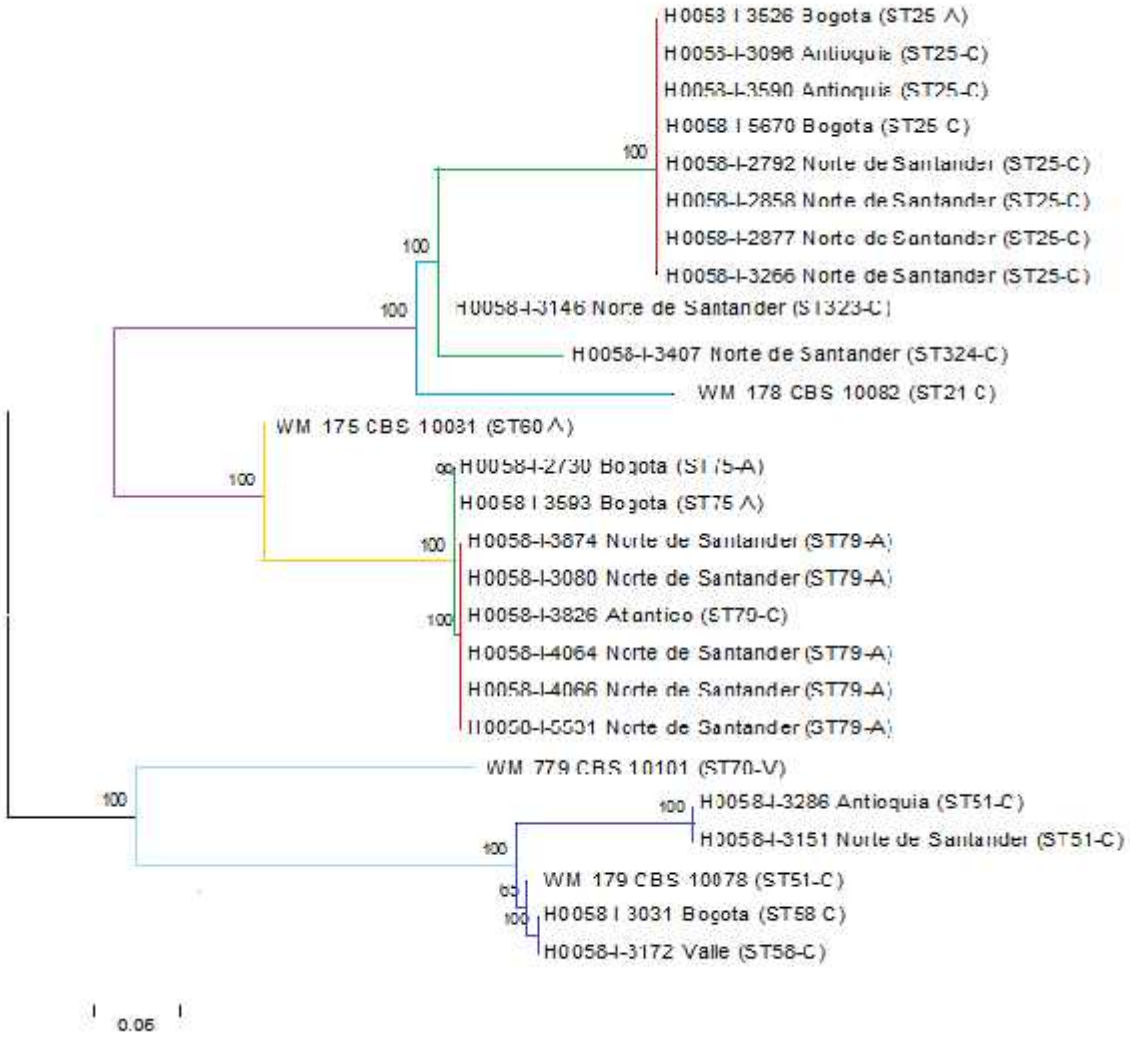


Figura 3. *Análisis filogenético de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Jukes-Cantor (170), utilizando secuencias de nucleótidos concatenados de 7 loci y una secuencia representativa para cada tipo MLST. Los valores de Bootstrap se muestran para cada rama (1000 repeticiones); (A: aislamientos ambientales; C: aislamientos clínicos)*

Figura 4. *Análisis filogenético de aislamientos clínicos y ambientales de C. gattii. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Jukes-Cantor (170), utilizando secuencias de nucleótidos concatenados de 7 loci y una secuencia representativa para cada tipo MLST. Los valores de Bootstrap se muestran para cada rama (1000 repeticiones); (A: aislamientos ambientales; C: aislamientos clínicos)*



De los 109 aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii* genotipificados por MLST, el 20.8% son de Norte de Santander, el 18,3% de Antioquia, el 17,4% de Valle, el 15,6% de Bogotá, 14,6% de Atlántico y el 13,7% de Cauca. Las secuencias tipo que compartían aislamientos de origen

clínicos y ambientales se agruparon en diferentes departamentos; para *C. neoformans*, el ST93 se identificó en los seis departamentos en muestras ambientales y clínicas, el ST77 se identificó en cinco departamentos (Antioquia, Atlántico, Cauca N. Santander y Valle), para *C. gattii* el ST25 se identificó en tres departamentos (Antioquia, Bogotá y N. Santander) y el ST79 se identificó en dos departamentos (Atlántico y N. Santander) (Anexo 6).

La caracterización por MLST de aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* y *C. gattii* en seis departamentos de Colombia reveló una alta diversidad genética, al encontrar 13 y 7 secuencias tipo diferentes para cada especie, respectivamente. Lo anterior se relaciona con la investigación realizada por Beale A, et al., en el 2015, quienes reportaron para Sudáfrica 50 secuencias tipo diferentes entre 230 aislamientos de *C. neoformans* var. *grubbii*, para la ciudad del Cabo y Pietermaritzburg, KwaZulu-Natal; los autores concluyen un alto nivel de diversidad genética y alta variabilidad (171).

Estos datos contrastan con estudios que reportan una baja diversidad genética por MLST en países como Tailandia, Canadá, EE.UU. y Australia oriental, donde pocos genotipos se han identificado entre un número mucho mayor de los aislamientos estudiados (172-174). Por ejemplo, el estudio realizado por Simwami *et al*. en el 2011 mostró una baja variación genética entre 183 aislamientos evaluados, de los cuales el 47% de los aislamientos se agruparon en tres secuencias tipo diferentes (ST4, 5 y 6) (designado como ST44, 45 y 46, respectivamente) (32).

En el presente estudio se identificaron cuatro secuencias tipo (ST93, 25, 77 y 79), que se encuentran en aislamientos clínicos y ambientales para *C. neoformans* y *C. gattii*; sugiere que los ST que circulan en el ambiente son los mismos que están infectando a la población. Por ejemplo, el ST93 encontrado en los 6 departamentos fue la secuencia tipo más frecuentemente encontrada, en un 33.9% del total de los aislamientos estudiados, y es una de las secuencias

ampliamente reportados en diferentes países como China, India, Indonesia, Sudáfrica, Uganda, Tailandia entre otros (32, 175-176). Desnos et al., en el 2015 reporta la presencia del ST77 en casos clínicos en una cohorte francesa del 1997-2001 (177), en el estudio de Khayhan K, et al., se reportó en casos clínicos en India (178), Kaocharoen S y et al., reportó esta secuencia tipo en muestras ambientales en Tailandia, estos estudios se relaciona en el presente estudio al aislar esta secuencia de un caso clínicos y muestras ambientales (174).

Se identificaron secuencias tipo que contenían sólo aislamientos clínicos o sólo aislamientos ambientales, lo cual puede sugerir la presencia de nichos adicionales de estas especies que pueden estar causando infecciones en humanos. Por ejemplo el ST5 el cual solo se encontró en casos clínicos, fue encontrado previamente y es el principal ST en China, Japón y Corea del Sur, Asia oriental, Tailandia en casos clínicos y muestras ambientales, aunque se ha reportado en casos veterinarios en gatos por Danesi et al., en el 2014 (179). Khayhan K y et al., en el 2013 tipificaron por MLST 476 aislamientos clínicos y ambientales de diferente países de Asia y el Medio Oriente y encontraron 28 secuencias tipo; las secuencias predominantes fueron los ST4-6 y ST93, en casos clínicos y muestras ambientales (178).

El ST 63 se ha reportado en casos clínicos y veterinarios, con mayor frecuencia en el continente Africano (178), y se ha reportado en casos veterinarios en Italia (179);en el presente estudio se aisló de un caso clínico. El ST23 se ha reportado con mayor frecuencia en casos clínicos en Kuwait y se ha reportado en el ambiente en Japón, Estados Unidos, Asia, África y Europa en el ambiente y muestras clínicas; en el presente estudio se aisló del ambiente y fue una de las secuencia tipo más frecuentes del estudio (180-182). ST51 fue encontrado en Australia, China, India, México, Papua Nueva Guinea y EE.UU., en muestras clínicas, veterinarias y ambientales; en el presente estudio solo fue posible aislarla de casos cínicos. El ST75 se ha reportado en

muestras ambientales y veterinarias en California. ST58 ha sido descrito en los Países Bajos, Alemania y EE.UU y el ST25 fue reportado en una cepa de Aruba (175, 178, 183-185).

A nivel mundial, y de acuerdo con los resultados de diversas investigaciones, las estructuras genéticas varían dependiendo de la ubicación geográfica. Las genéticas de la criptococosis poblaciones de Asia Oriental contiene estructuras menos diversas con respecto a las poblaciones Europeas de África y América del Norte y Sur (32, 175-176, 178, 184 - 188).

Una posible explicación de la diversidad y distribución de las secuencias tipo observada en la población y en el ambiente, puede deberse a la asociación de *C. neoformans* con el excremento de aves. La dispersión se puede producir a través de la ruta migratoria que realizan las aves desde América del Norte, central y Sur América hacia Colombia, fenómeno que puede contribuir a la distribución de estos genotipos. La dispersión de *C. gattii* puede deberse a la introducción de árboles como el *Eucalipto sp* y la *Acacia Amarilla* provenientes de Australia, país con una amplia distribución de esta especie en el ambiente (189).

En el presente estudio, no fue posible relacionar variables clínicas y demográficas de *C. neoformans* y *C. gattii* con secuencias tipos ya que es necesario un mayor número de muestras de aislamientos clínicos y ambientales. Aunque diferentes estudios detectaron asociaciones entre las variables clínicas y la evolución de la enfermedad, como se ha descrito previamente por Simwami S, et al, quienes encontraron asociación entre secuencias tipo y la progresión de la enfermedad. Esto es probablemente debido al hecho de que 95% de los aislamientos fueron ST44 o ST45, que difieren en un solo locus para toda la cohorte estudiada (32).

El esfuerzo para aumentar el conocimiento sobre la genética de las poblaciones *de C. neoformans* y *C. gattii* recae en la aparición de genotipos específicos asociados a la enfermedad y dispersión de poblaciones genéticas. MLST mostró variación genotípica significativa entre *C. neoformans* y

C. gattii en seis departamentos de Colombia, sin embargo las secuencias tipo frecuentemente reportadas indican que en el país existe una diversidad de cepas circulantes en el ambiente que pueden causar enfermedad. Sin embargo, se sugiere ampliar la cohorte en los demás departamentos para continuar detectando cepas circulantes y su distribución.

7.3 Objetivo específico Nº 3

Estudiar los principales factores de virulencia por cada secuencia tipo identificada de C. neoformans y C. gattii.

De las 20 secuencias tipo obtenidas, se seleccionó un representante de cada ST, para las secuencias tipo que presentaban los dos tipos de origen estudiados (clínico y ambiental) se seleccionaron dos aislamientos uno para cada origen (ST25, ST77, ST79 y ST93) (Tabla 10), esto con el fin de evaluar los factores de virulencia de cada secuencia tipo.

Entre los factores de virulencia de *C. neoformans* y *C. gattii* evaluados se observó la capacidad que presentan las cepas para crecer a temperatura fisiológica, las diferencias en el tamaño capsular y celular (pre-inoculación y pos-inoculación), el fenotipo de colonias, switching fenotípico, la determinación de la pareja sexual por PCR y la actividad enzimática, evaluando la síntesis de algunas enzimas (actividad proteolítica, fosfolipasa y fenoloxidasa) que confieren ciertas ventajas adaptativas de la levadura en el ambiente y en el hospedero.

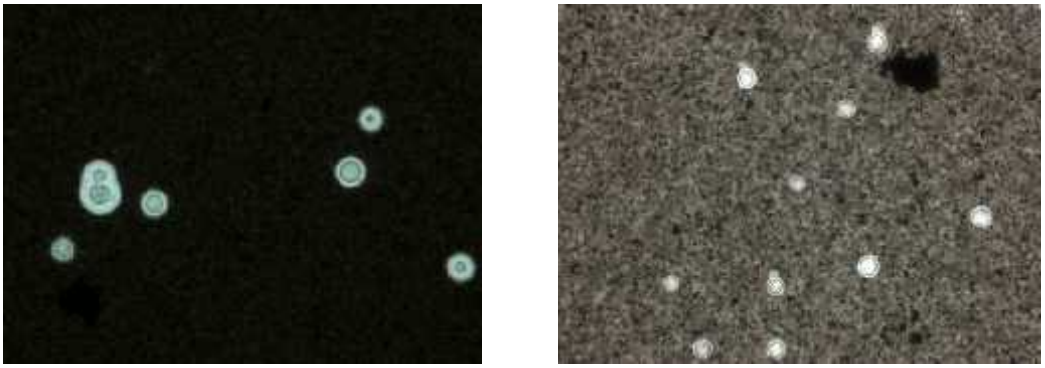
Crecimiento a 37 °C

Al evaluar el crecimiento a 37 °C de los 13 STs para *C. neoformans* y siete STs para *C. gattii*, se determinó que los 24 aislamientos evaluados poseen la capacidad de crecer a temperatura fisiológica, factor de virulencia muy importante para el desarrollo de la infección en mamíferos (97).

Tamaño capsular y celular

El promedio del tamaño total de la célula para *C. neoformans* fue de 6. 10µm y para *C. gattii* 4.9µm, con respecto al tamaño capsular se observó que *C. gattii* presenta un mayor diámetro de cápsula, con un promedio de 0.6µm respecto a 0.46µm para células de *C. neoformans*. El 62,5% de los aislamientos evaluados presentaron cápsulas pequeñas para las dos especies y se observó que las cápsulas más grandes se presentaron en ST's provenientes de origen clínico con respecto a células ambientales. La secuencia tipo que presentó un diámetro capsular mayor fue el ST324; para el diámetro celular se observaron los valores más altos en los ST2, ST93 (Figura5, Anexo 7).

Figura 5. *Coloración con tinta china de ST93 clínico (A) y ST93 ambiental (B) de C. neoformans (40X).*

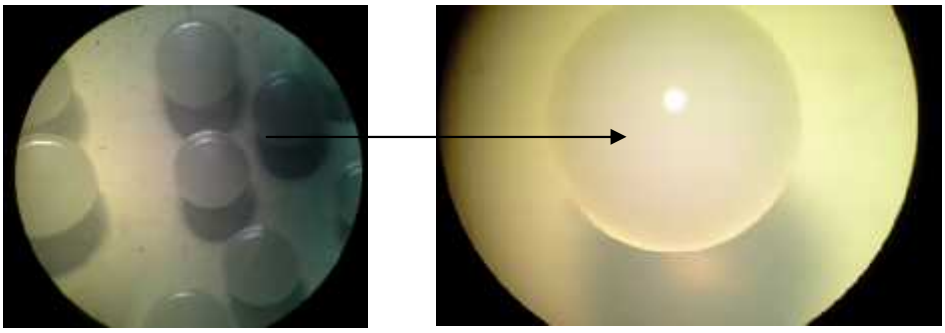


A B

Fenotipo de las colonias

Los 20 STs evaluados mostraron bordes lisos y colonias mucoides. El promedio del diámetro de la colonia para las secuencias tipo en *C. neoformans* fue de 3.7 mm con valores máximos de 5.6 mm y valores mínimos de 3 mm; para *C. gattii* fue de 3.8 mm con valores máximos de 4.8 mm y valores mínimos de 2.3 mm. Para las dos especies se observó que las colonias más grandes se presentaron en STs provenientes de origen clínico con respecto a STs de origen ambiental (Figura 6, Anexo7).

Figura 6. *Fenotipo de colonias presente en aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii*



**En la figura se observa colonias lisas.*

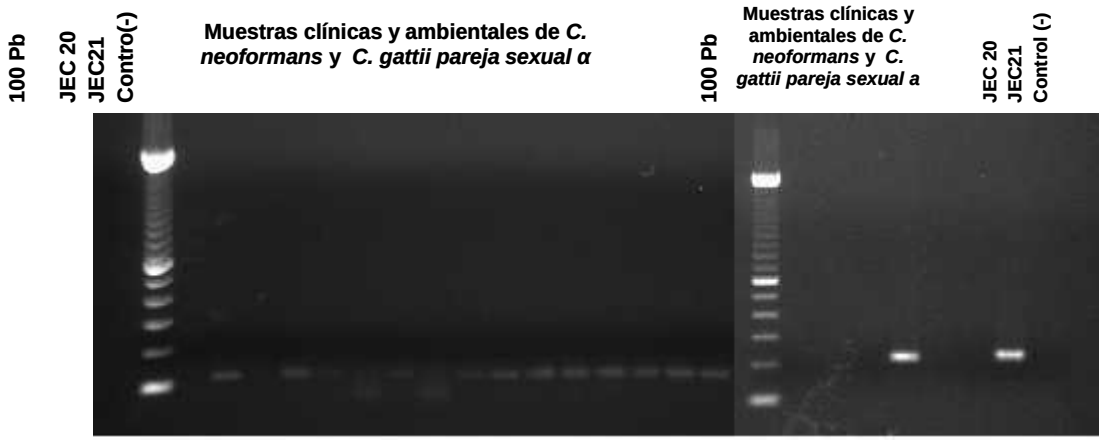
Determinación de la frecuencia del switching

En general el 66.6% de los aislamientos mostró capacidad de cambio, lo cual se presentó con mayor frecuencia en secuencias tipo de origen clínico (n=7). De los 13 ST's evaluados para *C. neoformans* se observó que el 73,3% de los aislamientos presentaron esta capacidad de cambio y de los siete STs para *C. gattii* el 55.5%; tan solo un 33.3% de los aislamientos evaluados no presentó esta capacidad de cambio (Anexo7).

Determinación de la pareja sexual a ó α

El 100% de las secuencias tipo analizados para *C. neoformans* fueron tipo alfa, para *C. gattii* el 55,5% de los STs fueron pareja sexual alfa y el 44,4% restante fue pareja sexual a. Las secuencias tipo que agrupaban aislamientos clínicos y ambientales presentaron consistencia entre la pareja sexual: el ST93, 77 y 79 fueron pareja sexual alfa para los aislamientos de origen clínico-ambiental y el ST25 fue pareja sexual a (Figura 7, Anexo 7).

Figura 7. *Pareja sexual a ó α presente en algunos de los aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii.*



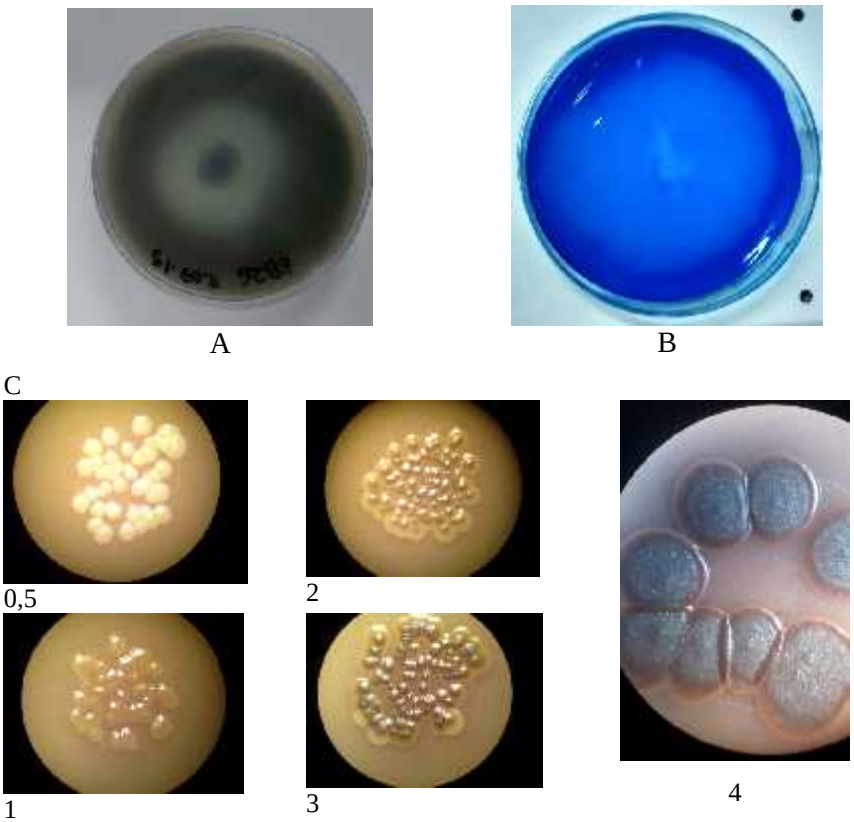
A B

*En la figura A, se observa la pareja sexual *α* de aislamientos clínicos y ambientales; en la figura B, se observa la pareja secual a de aislamientos clínicosy ambientales.

Determinación de actividad enzimática

De los 13 STs evaluados para las actividades enzimáticas: proteasa, fosfolipasa y fenoloxidasa se observaron diferencias en cuanto a la actividad. En general para las secuencias tipo de *C. neoformans* el 46.6% de los STs presentaron actividad de proteasa alta, el 66.6% presentaron actividad de fenoloxidasa baja y el 40% presentaron actividad de fosfolipasa alta, este comportamiento enzimático fue similar para *C. gattii* donde se observó actividad alta, baja y media para la actividad de proteasa, fosfolipasa y fenoloxidasa en un 66.6%, 44,4% y 55,5% respectivamente (Figura 8, Anexo 7).

Figura 8. *Actividad enzimática de: A: Fosfolipasa, B: proteasas y C: Fenoloxidasa de aislamientos clínicos y ambientales de C. neoformans y C. gattii*



*en la figura se observa los resultados de las diferentes actividades enzimaticas evaluadas

Modelo Invertebrado "Galleria mellonella"

Se inocularon larvas de *G. mellonella* con aislamientos clínicos y ambientales representativos de las 20 secuencias tipo de *C. gattii* y *C. neoformans* para realizar un análisis de supervivencia, en el cual se que la muerte promedio ocurrió en ocho días con las dos especies (Figura 9). Mediante la comparación de las curvas de supervivencia y tiempos medios de supervivencia de las larvas inoculadas con cepas diferentes, se determinó que para *C. neoformans* los STs 5, 71 y 93 eran los más virulentos, con media de supervivencia de 3, 4 y 5 días respectivamente después de la infección; para *C. gattii* se determinó que los STs 25, 58 y 75 eran los más virulentos, con medias de supervivencia de 5 y 6 días después de la infección.

En general, cuatro de las 20 secuencias tipo identificadas para *C. neoformans* y *C. gattii* (ST5, ST58**,** ST71 y ST93C) eran comparables con el control de alta virulencia H99 (supervivencia media de 3 días ($p < 0,05$)), en contraste con las secuencias tipo ST32, ST40, ST56 y ST79C, con virulencia comparable a la cepa JEC 20, control de baja virulencia

Las secuencias tipo ST5 y ST93C para *C. neoformans* y el ST58 para *C. gattii* fueron responsables de la mayor mortalidad de larvas en menor tiempo. Con respecto a las secuencias tipo que compartían aislamientos clínicos y ambientales se observó una relación en el tiempo de supervivencia para el ST77 con una media de 10 días; en contraste con los STs 25 y 93 donde no se observó una relación en el tiempo de supervivencia, con una diferencia de media de 6-8 y 2-5 días respectivamente para cada ST, siendo el aislamiento clínico el primero en morir. Por otra parte, el ST79 no compartió el mismo tiempo de supervivencia y se observó que el aislamiento ambiental fue el primero en morir, con una media de 9 días con respecto al clínico con una de 11 días.

- *Tamaño celular y capsular*

El tamaño de la cápsula de los 20 STs evaluados en el modelo invertebrado aumentó para las dos especies con una mediana de 1.62 µm pos-inoculación con respecto a un 0,47 pre-inoculación con un cambio ≤ al 1.15 µm en promedio. Esto contrasta con el tamaño de las células donde varió desde 1,70- 7,53µm pre-inoculación y 4.05- 6.8µm, pos-inoculación observándose células más pequeñas al pasar por el modelo. Al observar individualmente cada ST se observó que los STs 2, 63 y 93, este último de origen ambiental, no presentaron un cambio evidente en el tamaño celular y capsular, el cual? osciló ≥ 40 µm. Este efecto del cambio del tamaño celular y capsular se comprobó utilizando la prueba McNema, generado con un 95% de confianza para cada medición,

donde se encontró que hay diferencias estadísticamente significativas en el aumento del tamaño capsular y celular ($p<0.005$) (Anexo 8).

Adicionalmente se evaluó nuevamente el fenotipo de colonias antes y posterior a la inoculación, y no se observaron cambios en cuanto a la textura y morfología de la colonia. Sin embargo, el tamaño varió, aumentando significativamente su diámetro con una media de 3.7 mm a 4.6 mm (Anexo 8).

La mayoría de los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo típicamente reportado a nivel mundial en cuanto a tipo de pareja sexual, fenotipo de colonias y capacidad de switching fenotípico. Diversos estudios coinciden que el tipo de pareja sexual α es considerado como un factor asociado a una alta virulencia (190-191) y a su vez es dominante para? la especie *C. neoformans,* tanto entre aislamientos clínicos y ambientales, a nivel mundial (192). La morfología mucoide ha sido asociada con una alta virulencia (39, 95, 160, 192-193), aunque este factor de virulencia puede estar condicionado a cambios fenotípicos de las morfología inicial dado a su capacidad para hacer switching fenotípico en respuesta a las condiciones del ambiente. Esto lo reporta Fraser et al., en el 2005, al describir aislamientos procedentes del brote de Vancouver, en los cuales las morfologías de las colonias en un 95% fueron no mucoides de aspecto liso, caracterizadas por su alta virulencia (194), lo cual se relaciona en la presente investigación con el tipo de aspecto de las colonias y difiere con la textura.

Se observó que la actividad enzimática para las tres enzimas varía dependiendo de cada cepa, los resultados obtenidos de las diferentes actividades enzimáticas se relacionan con estudios previos realizados en Colombia, donde se ha observado actividad proteolítica, fosfolipidica y de fenoloxidasa en aislamientos clínicos y ambientales. El trabajo de Sanchez *et al*. describe un

27%, 47% y 32% correspondiente a una actividad alta, media y baja en las enzimas proteolítica, fosfolipidica y de fenoloxidasa respectivamente en aislamientos de *C. gattii* (95).

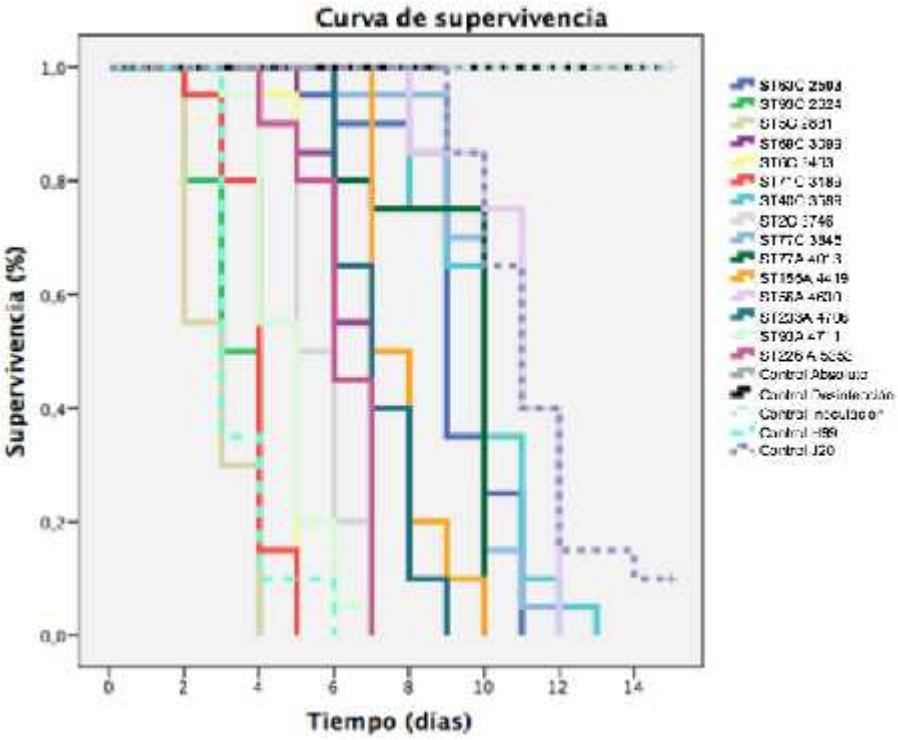
Los estudios de patogénesis de microorganismos en huéspedes invertebrados durante la última década han contribuido al conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la patogénesis y la defensa del huésped. Las larvas de *G. mellonella*, se han utilizado para estudiar la infección por diversos patógenos, incluyendo *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Bacillus cereus y Candida spp.*, entre otros (110,113, 195). En el presente trabajo se evaluó el tamaño capsular y celular, se determino pre-inoculación y pos-inoculación en el modelo invertebrado, se observaron cápsulas significativamente mayores después de que el hongo paso por la larva para las dos especies, lo cual se relaciona con varios estudios de patogenicidad como el realizado por Firacative et al., en el 2014, al encontrar tamaño celular y capsular incrementados después de la inoculación donde el tamaño total de células de *C. gattii* antes de la infección varió entre 5 a12 micras, el tamaño total de las células después de la infección varió de 15 a 75 micras (118).

Sin embargo se observó que tres aislamientos clínicos no presentaron un cambio significativo en el tamaño capsular, lo que coincide con varias investigaciones al encontrar cápsulas pequeñas o células sin cápsulas recuperadas de casos clínicos. Kimura et al., reportó un caso de criptococosis pulmonar debido a una cepa sin cápsula en un paciente con hepatocarcinoma (196). Laurenson et al., informó de un caso de meningitis sin cápsula en un paciente infectado por el VIH (197). Moser et al., reportó este mismo fenómeno en un paciente con blastomicosis pulmonar (198), entre otros (199-200). Estudios realizados por Salkowski y Balish de modelos en animales, mostraron que una cápsula no siempre es necesaria para que *C. neoformans* y *C. gattii* pueda causar enfermedad en ratones (201).

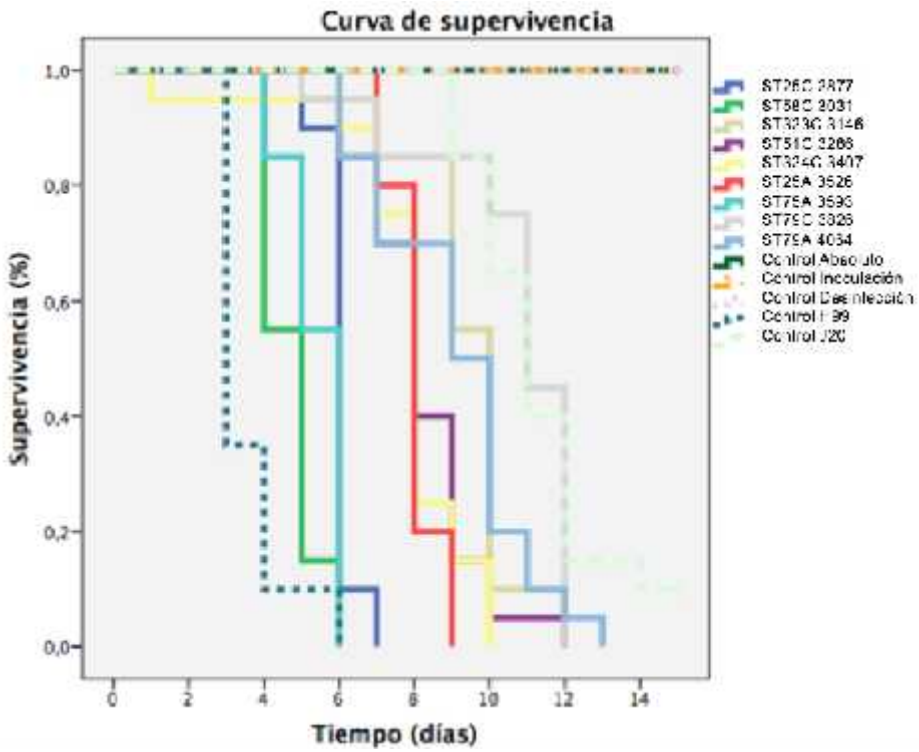
En conclusión, el presente estudio demostró que la virulencia no está asociada específicamente a un determinado factor de virulencia. Diversos estudios han determinado que la virulencia de una cepa es muy variable no sólo entre diferentes aislamientos sino entre células de una misma cepa, demostrando que diferentes factores pueden intervenir en la virulencia. Se relacionaron secuencias tipo con factores de virulencia y se evidenció que las secuencias con mayor mortalidad se asociaron a tamaños capsular y morfológicos más grandes recuperadas en la pos-inoculación, mientras que la actividad enzimática varío entre las diferentes secuencias tipo evaluadas.

Entre las secuencias tipo evaluadas de aislamientos de casos clínicos y muestras ambientales se puede decir que tan solo en una secuencia tipo (ST77)se observo una relación de la mortalidad y los factores de virulencia presentando valores similares entre las pruebas, sin embargo con esta evidencia no se puede decidir que los ST se encuentran relacionados con los factores de virulencia; se sugiere en futuras investigaciones ampliar la cohorte de los aislamientos relacionados con cada secuencias tipo para ser evaluados por los diferentes factores de virulencia, como lo propone Beale M, et al., en el 2015, quien genotipificó por MLST una cohorte de 230 casos clínicos en Sudáfrica para realizar un estudio de diversidad genética de *C. neoformans*, y buscó relaciones entre el genotipo, fenotipo y presentación clínica de la enfermedad. Los autores concluyen que las diferencias clínicas y fenotípicas fueron detectables entre los linajes genéticos, sin embargo explicar las complejas relaciones entre la diversidad genética, la presentación de la enfermedad y el resultado en un huésped es difícil (171).

Figura 9. *Curva de supervivencia de (A) C. neoformans y (B) C. gattii, de secuencias tipo de origen clínicos y ambientales*



A: C. neoformans



B: C. gattii

7.4 Objetivo específico Nº4

Determinar si existe una diferencia en la distribución geográfica entre las especies de C. neoformans y C. gattii, delimitando áreas donde el hongo se puede dispersar en el futuro, empleando el modelo de nicho ecológico.

Casos clínicos y ambientales

Entre el período 1987-2014 a través de la encuesta nacional para la criptococosis en Colombia se notificaron 1112 casos clínicos provenientes de 24 departamentos de los cuales 1074 son *C. neoformans* var. *grubbii*, tres casos *C. neoformans* var. *neoformans* y 33 *C. gattii*. Un total de 17.483 muestras ambientales provenientes de 11/311 especies de árboles y 1.074 muestras de material biológico (excremento de aves) provenientes de 2/11 especies de aves. Estas muestras se recuperaron de 11 departamentos en el periodo del 1987 al 2014, de las cuales 451 son *C. neoformans* y 75 *C. gattii*.

Capa jackknifing de datos Ambientales

Se construyeron tres modelos de nicho ecológico, dos para *C. neoformans* clínico y ambiental, respectivamente y uno para *C. gattii* casos clínicos y ambientales en un mismo conjunto. Los datos de entrada para cada modelo se dividieron en dos: un 50% para la determinación de las capas influyentes y un 50% se utilizo para la creación del modelo de nicho ecológico teniendo como base las capas influyentes previamente obtenidas. Cada modelo se enfrenta inicialmente contra 38 capas ambientales, 19 de temperatura, 12 precipitación, tres topográficas y cobertura del suelo, respectivamente, y una de suelo. Los modelos fueron creados con un >80% de precisión, cada modelo inicialmente se corrió con 1000 repeticiones para identificar las capas influyentes, al finalizar se obtuvo un consolidado de capas y se identificaron aquellas que son

influyentes para cada modelo donde los errores de omisión y comisión (error tipo I y II) son más bajos y la precisión más alta (Tabla 11). Los aislamientos ambientales en el modelo de *C. neoformans* clínico se superponen con el propósito de la validación del modelo y viceversa. Para la creación del modelo de *C. gattii* se validaron con los casos clínicos y ambientales, para verificar la exactitud de predicción del modelo.

Modelo de nicho ecológico

Se realizaron tres mapas de predicción de nicho ecológico: dos de *C. neoformans* (basados en datos clínicos y en datos ambientales) y uno de *C. gattii* (reúne datos clínicos y ambientales). Para la creación del modelo se emplearon casos humanos confirmados por el Grupo de Microbiología del Instituto nacional de Salud y lugares positivos de muestreo ambientales, usando solo las capas de datos ambientales significativas (Tabla 11).

El modelo de predicción de *C. neoformans* basado en datos clínicos revela la presencia de nichos ecológicos óptimos a lo largo de la cordillera oriental (se extiende en dirección suroeste-nordeste desde el Macizo Colombiano en el departamento del Cauca hasta la serranía de Perijá, en La Guajira) comprometiendo parcialmente la cordilleras occidental, central y pico Cristóbal Colon. La región caribe, pacífica y parcialmente la región andina son áreas potenciales donde el hongo se puede presentar en un futuro (Figura 10).

El modelo de predicción de *C. neoformans* basado en datos ambientales revela la presencia de nichos ecológicos óptimos a lo largo de la cordillera oriental, occidental, central y la región caribe. Las áreas potenciales se presentan en las cercanías de las áreas óptimas en las ciudades de Ocaña, Montería, Caucasia, Buenaventura, Quibdó y los parques nacionales de Paramillo y Serranía de la Macarena. Adicionalmente sobre el mapa creado para el modelo de *C. neoformans*

ambiental se puede observar la distribución de las secuencias tipo en seis departamentos. (Figura 11, Anexo 9).

El modelo de predicción de *C. gattii* basado en casos clínicos y datos ambientales revela la presencia de nichos ecológicos óptimos a lo largo de la cordillera oriental y la región caribe, parcialmente en las zonas sur de las cordillera occidental y central. Las áreas potenciales se presentan en las cercanías de las áreas óptimas. Adicionalmente sobre el mapa creado para el modelo de *C. gattii* se puede observar la distribución de las secuencias tipo en seis departamentos (Figura 12, Anexo 9).

En general, la distribución ambiental de *C. neoformans* y *C. gattii* presente en los modelos de predicción reflejan la interacción que presenta el hongo con ciertas variables macro-ecológicas; la precipitación (abril, julio, anual, mes más lluvioso, trimestre más húmedo, el invierno más frío) parece tener un papel importante en determinar el nicho ecológico de *C. gattii.*

Una limitación del modelo de *C. gattii* fue el uso de datos clínicos y ambientales en un mismo conjunto con el fin de obtener el modelo predictivo, debido al registro de datos. Esto introduce incertidumbre en la ubicación del caso clínico o ambiental y tiene el potencial para dar lugar a error de modelado. Sin embargo, Mak et al. (18) han demostrado el uso exitoso de modelos de nicho ecológico de *C. gattii*, basado en casos humanos y animales.

La validación del modelo de *C. neoformans* ambiental se realizó mediante la superposición de los casos clínicos. Se observó que de las 51 historias clínicas, 50 se localizaron en el nicho ecológico previsto de *C. neoformans,* con lo que se valida aún más la precisión de la predicción del modelo.

Se identificaron nichos no aptos para las dos especies; éstos incluyen las regiones tropicales (clima caliente y humedad elevada con fuertes lluvias) a lo largo de la costa del Pacífico y la cuenca del río Amazonas y la región Orinoquia en el oeste de Colombia.

Las capas de datos ambientales utilizados para la creación de los modelos muestran que Colombia cuenta con un grupo de variables macro-ecológicas donde la presencia del hongo es adecuada, debido a la ubicación estratégica de Colombia en el continente Sur Americano, donde es atravesada por la zona Ecuatorial. Esta ubicación determina la existencia de una gran variedad de climas y ecosistemas; por lo tanto, el país no tiene temporadas y sólo un invierno lluvioso y un verano seco.

La modelación de casos clínicos y ambientales para *C. neoformans* y *C. gattii* y las interacciones macro-ecológicas que presentaron en el modelo de predicción reflejan la capacidad que tiene GARP para estructurar y controlar el proceso del desarrollo del modelo, basado en reglas de decisión. En los últimos años se ha empleado este programa para la predicción de algunas especies de hongos en diferentes partes del mundo. En el 2005 Fisher M y colaboradores, describieron la baja dispersión eficaz de genotipos asexuales en *Penicillium marneffei*, identificaron la presencia del hongo en el sureste de Asia, aplicando GARP a esta investigación demostró que el hongo puede dispersarse en diferentes ambientes pero no puede mantenerse en éstos debido a que el hongo ha prescindido en gran medida de la reproducción sexual, lo que significa que su capacidad para adaptarse es limitada (147). Baptistar R, et al., en el 2007, realizaron un modelo de nicho ecológico fundamental en *coccidioidomicosis* en el sur de California y Arizona (EE.UU.) y Sonora (México) utilizando variables ambientales y los puntos de referencia geoespacial, modeladas en GARP, y en el sistemas de Información Geográfica (SIG). Ellos identificaron la presencia del hongo en las zonas del sur de California, Arizona, Texas, Baja California y el norte de Méjico y sugieren que el nicho ecológico fundamental más probable de *Coccidioides spp*. se encuentra en las tierras áridas de los desiertos de América del Norte (148).

En este estudio se describe la utilidad de modelado de nicho ecológico para producir mapas de riesgo para *C. neoformans* y *C. gattii* en Colombia. Se encontró que el nicho ecológico de *C. gattii* en Colombia es muy diverso, estableciéndose en las ecorregiones subtropicales y templadas en el país. Esto sugiere que *C. gattii* es altamente adaptable a diferentes condiciones ecológicas en Colombia, así como a diferentes regiones del mundo.

Por último, es importante tener en cuenta que los modelos de predicción para *C. neoformans* y *C. gattii* describen las áreas de nicho ecológico para estas especies de hongos a escala regional, los mapas pueden ser utilizados por los médicos al considerar el diagnóstico de la criptococosis en pacientes que residen en dicha región o personas que tengan un viaje reciente a estas áreas geográficas.

Tabla 11. *Características de la creación de los tres modelos de nicho ecológico para C. neoformans y C. gattii en Colombia*

Puntos de entrada	Modelo	Capas de predicción ambiental	Capas significativas de predicción	Predicción y Exactitud
51	*C. neoformans* clínico	7	Abril, julio y el mes más lluvioso de la precipitación así como los trimestres más húmedos, más secos y más fríos y el índice de vegetación	92,4 % y 90 % (p <0,001)
60	*C. neoformans* ambiental	5	Altitud, las precipitaciones de abril, junio y julio y temperatura mínima de octubre	91,6% y 86,4% (p <0,001),
36	*C. gattii*	8	Precipitación de abril, julio y anual, precipitación del mes más lluvioso, trimestre más húmedo y más frío, suelo y el índice de vegetación	92,9% y 89,1% (p <0,001)

Figura 10. *Predicción de nicho ecológico para C. neoformans, mapa basado en la distribución de los puntos de casos clínicos en Colombia (aislamientos ambientales superpuestos).*

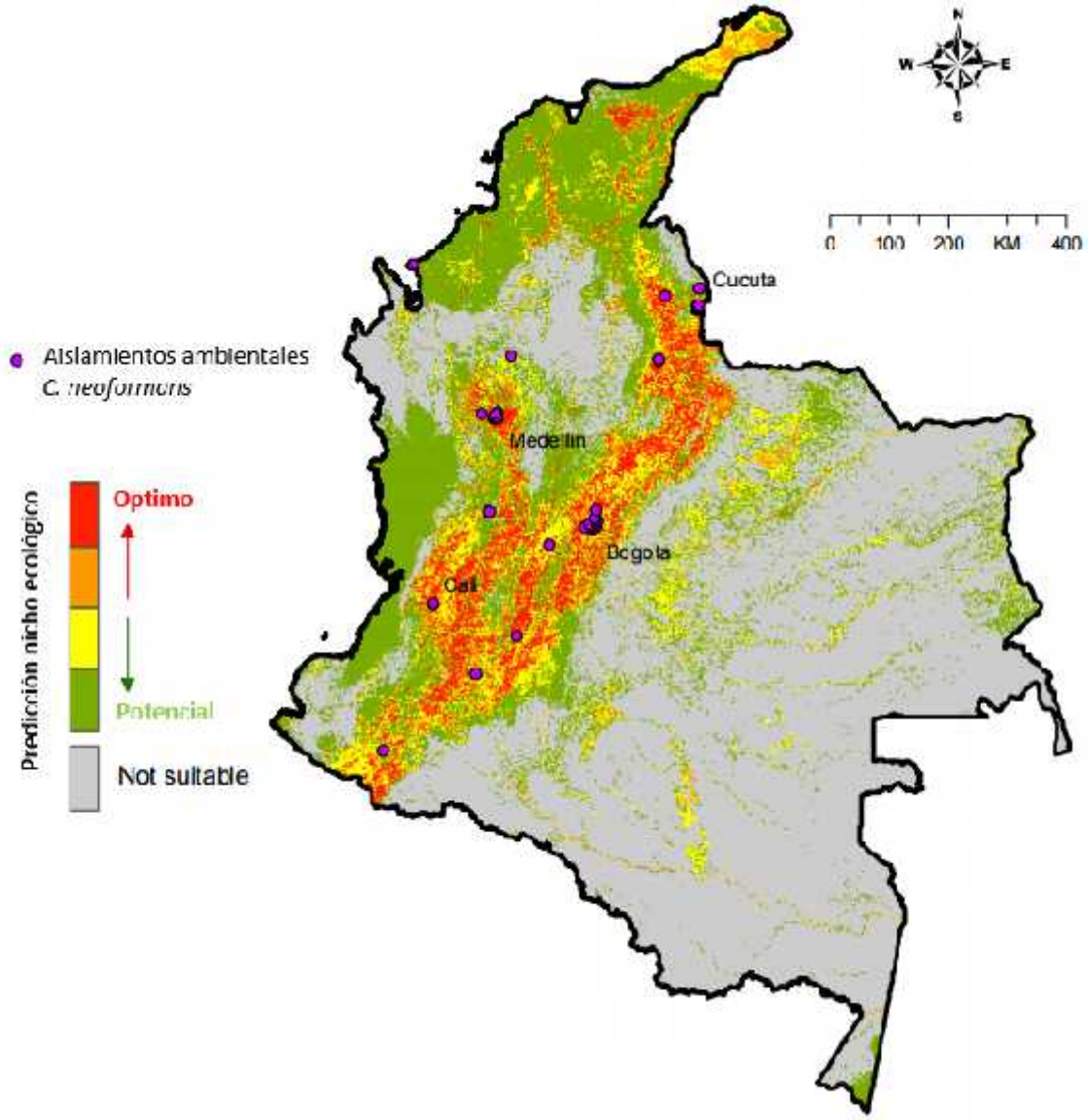


Figura 11. *Predicción de nicho ecológico para C. neoformans, mapa basado en la distribución de los puntos de muestreos ambientales en Colombia (casos clínicos superpuestos) y secuencias tipo en seis departamentos.*

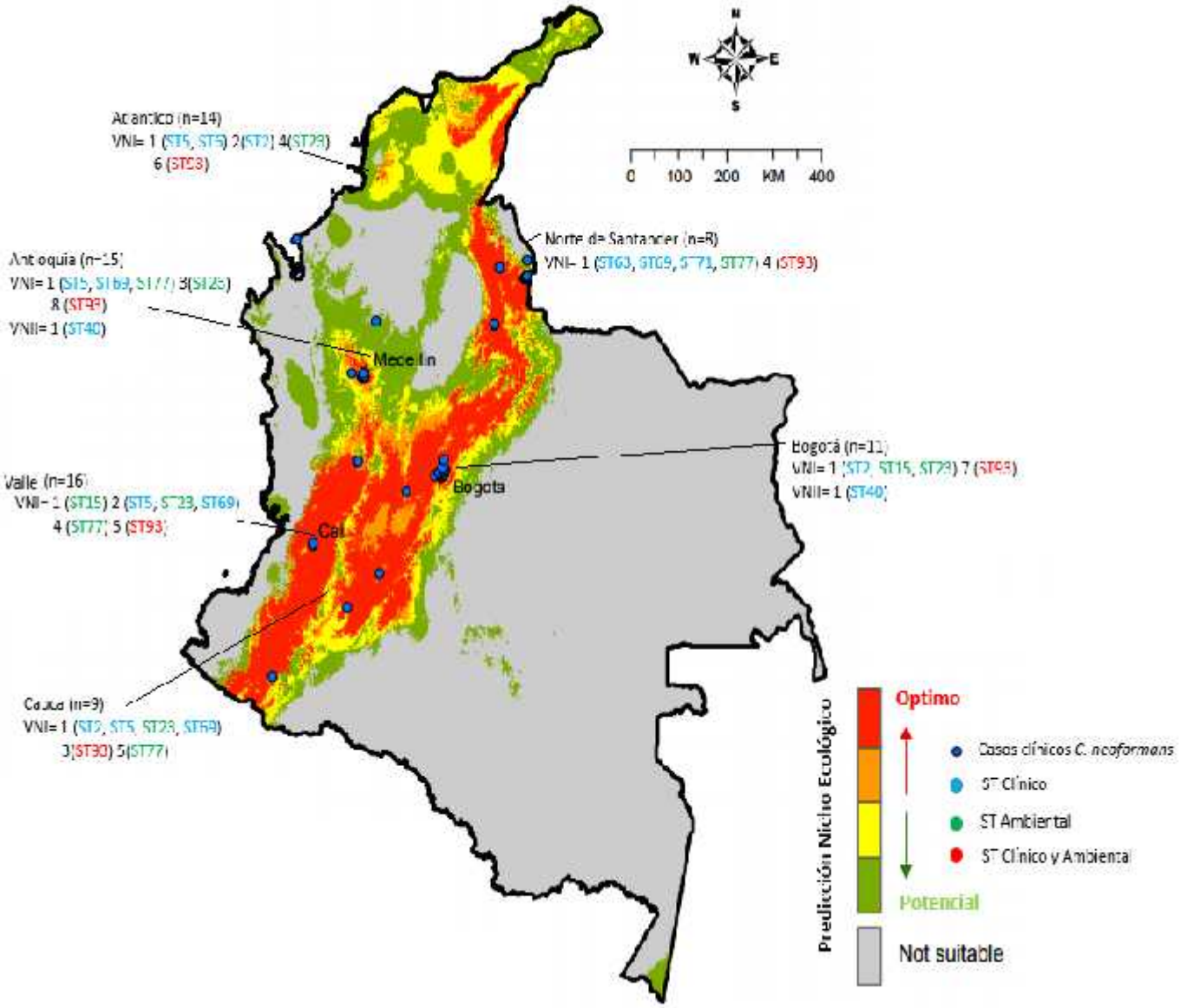
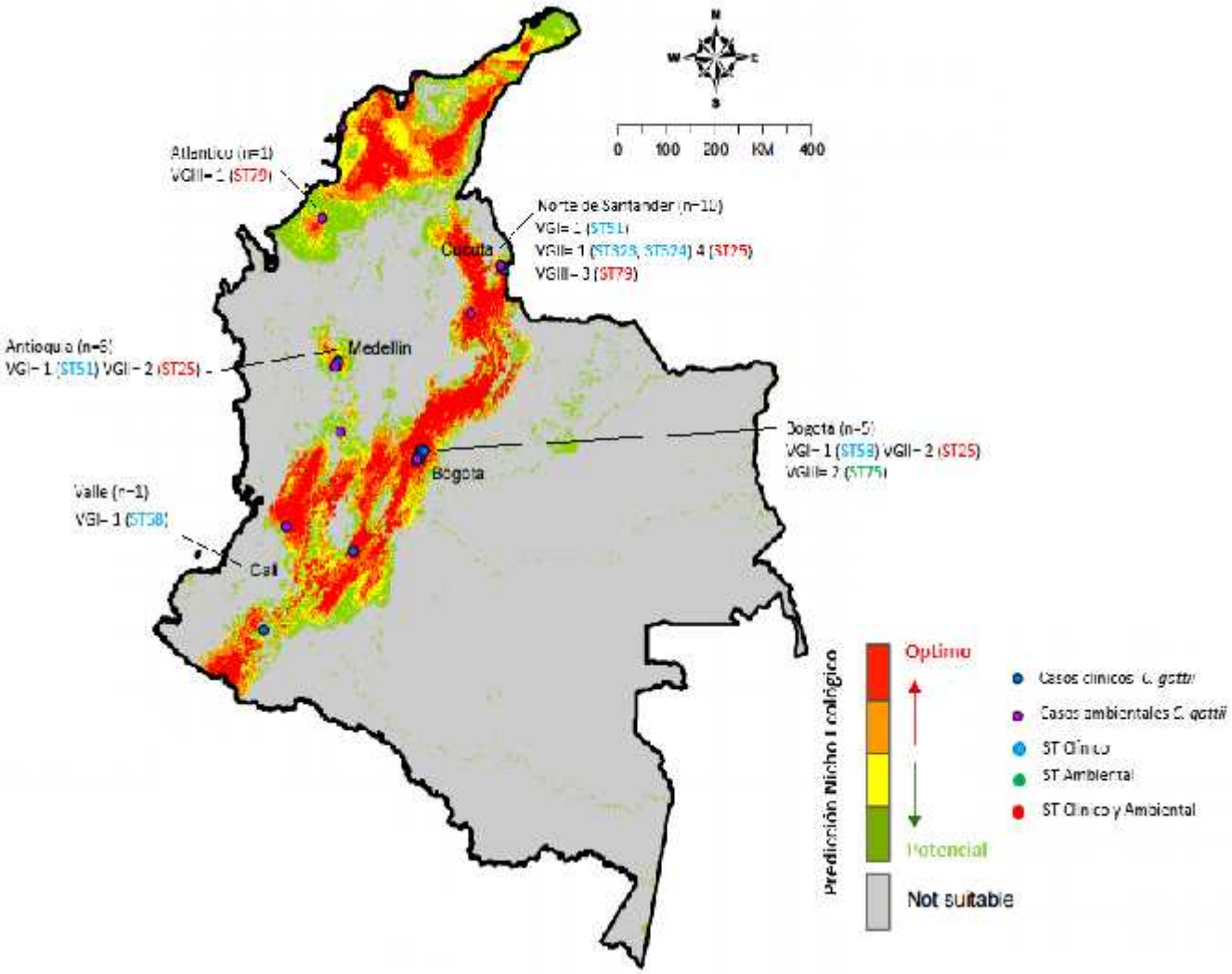


Figura 12. *Predicción de nicho ecológico para C. gattii, mapa basado en la distribución de los puntos de casos clínicos y ambientales en Colombia (casos clínicos y ambientales superpuestos) y secuencias tipo en seis departamentos.*



8. **Conclusiones**

1. En esta investigación se describe el uso de la técnica de MLST para la tipificación molecular de aislamientos de *C. neoformans/C. gattii* en Colombia, lo cual permitió determinar la secuencia tipo de aislamientos de origen clínico y ambiental *de C. neoformans* y *C. gattii*.
2. Los aislamientos Colombianos de *C. neoformans* y *C. gattii* evaluados poseen un alta diversidad genética encontrada en los diferentes departamentos estudiados.
3. La virulencia no está asociada con una secuencia tipo específica de *C. neoformans* y *C. gattii*, sino que se observó la combinación de caracteres individuales que reflejan diferentes factores de virulencia para cada aislamiento.
4. Mediante la prueba de supervivencia en el modelo invertebrado (*G. mellonella*), se observaron cambios en el tamaño de la cápsula, lo que concuerda con reportes durante la infección en mamíferos.
5. No se observaron diferencias entre las secuencias tipo y los factores de virulencia en el modelo invertebrado de *G. mellonella*, esto puede ser debido al bajo número de aislamientos analizados de cada secuencia.
6. Se observo en cepas ambientales al pasarlas por el modelo invertebrado un cambio en su expresión fenotípica en la pre y pos-inoculación. Adicionalmente permitió identificar cepas de interés, que pueden generar posteriores estudios en modelos mamíferos para determinar otro nivel la patogenicidad de esta levadura.
7. En este estudio se describe la utilidad de modelado de nicho ecológico para producir mapas de riesgo para *C. neoformans* y *C. gattii* en Colombia, adicionalmente éstos

pueden ser considerados por el personal de salud para un diagnóstico por criptococosis al observar signos y síntomas más la ubicación de personas que residen en dicha región o personas que tengan un viaje reciente a estas zonas geográficas.

8. Se encontró que el nicho ecológico de *C. gattii* en Colombia es muy variable, estableciéndose en zonas subtropicales y templadas en el país, lo que sugiere que esta especie es altamente adaptable a diferentes condiciones ecológicas.
9. Se amplió el conocimiento acerca de la epidemiología y ecología de este patógeno en Colombia.
10. Se demostró la importancia de combinar datos de casos clínicos, ambientales y datos moleculares para el estudio de la criptococosis, este enfoque fue esencial para identificar las asociaciones entre tipos de cepas.

9. Bibliografía

1 Cabral P, Wood L. Animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. Rev Ibe-roam Micol 1999; 16: 77–81.

2 Bovers M, Hagen F, Kuramae E, Hoogveld H, Dromer F, Germain G, et al. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* hybrid. Emerg Infect Dis. 2008; 14:7, 1105-08.

3 Escandón P, Bedout C, Lizarazo J, Agudelo C, Bello S, Castañeda E, et al. Cryptococcosis in Colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. Biomédica 2012; 32:386-98.

4 Mesquita M, Martins F, RibeiroT, Magalhães M, Silva E, Chagas M. Cryptococcosis, a risk for immunocompromised and immunocompetent individuals. OpenEpi 2013; 6: 9-17.

5 Franzot P, Salkin I, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol 1999; 37:3, 838–40.

6 Sorrell T. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med Mycol 2001; 39: 155-168.

7 Barnett J. A history of research on yeasts 14:1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. Review, Wiley Online Library Jun 2010; 27: 875–904.

8 Soares MC, Paula CR, Dias AL, Caseiro MM, Costa SO. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2005;47:1, 31-36

9 Ellis D, Pfeifer T. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol 1990; 28: 1642-1644

10 Pfeifer T, Ellis D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from California. J Infect Dis 1991; 163:929-930.

11 Escandón P, Quintero E, Granados D, Huérfano S, Ruiz A, Castañeda E. Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus spp*. en Colombia. Biomédica 2005; 25: 390-397.

12 Girish C, Prabu D, Mitani H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. Mycoses 2010; 53: 262-264.

13 Firacative C, Torres G, Rodríguez M, Escandón P. Primer aislamiento ambiental de *Cryptococcus gattii* de serotipo B, en Cúcuta, Colombia. Biomedica 2011; 31: 118-23.

14 Kwon-Chung K, Bennett J. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A 1984; 257:2, 213-218.

15 Ellis D, Pfeiffer T. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet 1990; 336:923-925

16 Springer D, Chaturvedi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. Emer Infect Dis 2010; 16:14-20.

17 Kidd E, Hagen F, Tscharke R. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). PNAS 2004; 101: 17258–17263.

18 Mak S, Klinkenberg B, Bartlett K. Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. Environ Health Perspect 2010; 118: 653-658.

19 Byrnes E, Bildfell R, Frank S, Mitchell T, Marr K, Heitman J. Molecular evidence that the range of the Vancouver island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. J. Infect Dis 2009; 199:7, 1081-1086.

20 Mora D, Pedrosa A, Rodrigues V. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Med Mycol 2010; 48:4, 561–569.

21 Nigam C, Gahlot R, Kumar V, Chakravarty J, Tilak R. Central nervous system cryptococcosis among a cohort of HIV infected patients from a University Hospital of North India J. Clinical and Diagn Res. 2012; 6:8, 1385-1387.

22 MacDougall L, Kidd S, Galanis E, Mak S, Leslie M, Cieslak P, et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada and its detection in the Pacific Northwest, USA. Emerg Infect Dis 2007; 13:42–50.

23 Meiring S, Quan V, Cohen C, Dawood H, Karstaedt A, McCarthy K, et al. A comparison of cases of paediatric-onset and adult-onset cryptococcosis detected through population-based surveillance, 2005–2007. Wolters Kluwer Health 2012; 26(18): 2307-2314.

24 Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. Australian Biochemist 2010;41: 12-15.

25 Massimo C. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica 2013: 1- 23

26 Meyer W, Marszewska K, Amirmostofina M, Igreja R, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by

PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis 1999; 20: 1790-1799.

27 Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Castañeda E, Huynnh M. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. Emer Infect Dis 2003; 9: 189–195.

28 Latouche A, Huynh M, Sorrell T, Meyer W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. Appli Environ Microbiol 2003; 69:2080-2086.

29 Olivares L, Martínez K, Bermúdez R. Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. Med Mycol 2009; 47: 713-721

30 Boekhout T, Theelen B, Diaz M. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 2001; 147:891-907.

31 Meyer W, Aanensen D, Boekhout T. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol 2009; 47:561–570.

32 Simwami S, Khayhan K, Henk D. Low diversity *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* multilocus sequence types from Thailand are consistent with an ancestral African origin. PLoS Pathogens 2011; 7:4, Article ID e1001343.

33 Litvintseva A, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell T. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana.Genetics 2006;172: 2223–2238.

34 Goldman DL, Lee SC, Mednick AJ, Montella L, Casadevall A. Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. Infect Immun 2000, 68: 832–83.

35 Grijpstra J, Tefsen B, van Die I, de Cock H. The *Cryptococcus neoformans cap10* and *cap59* mutant strains, affected in glucuronoxylomannan synthesis, differentially activate human dendritic cells. FEMS Immunol Med Microbiol 2009, 57: 142–150.

36 Fonseca FL, Nohara LL, Cordero RJ, Frases S, Casadevall A, et al. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. Infect Immun 78: 3861–3870.

37 Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Adv Appl Microbiol 2009, 68: 133–216.

38 McClelland EE, Bernhardt P, Casadevall A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. Infect Immun 2006; 74: 1500–1504.

39 Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. Microbiology 2001; 147: 2355–2365.

40 Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. PLoS Pathog 2010; 6: e1000953.

41 Zaragoza O, Garcia-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. PLoS Pathog 2010; 6: e1000945.

42 Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence 2010; 1: 475–482.

43 Mylonakis E, Moreno R, Khoury J, Idnurm A, Heitman J, Calderwood S, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Infection and Immunity 2005; 73:7, 3842-3850.

44 Lizarazo J, Linares M, Bedout C. Restrepo A, Agudelo C, Castañeda E. Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. Biomédica 2007; 27:94-109.

45 Castañeda A, Huérfano S, Rodríguez M, Castañeda E. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendros. Biomédica 2001; 21:70-74.

46 Quintero E, Castañeda E, Ruiz A. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* in the department of Cundinamarca, Colombia. Rev Iberoam Micol 2005; 22: 93-98.

47 Ordoñez N. Castañeda E. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. Biomédica 1994; 14:3

48 Castañeda A, Castañeda E. Aislamiento de especies de *Cryptococcus* asociadas con Eucalyptus en un parque de Bogotá. Biomédica 2001; 21:75-78.

49 Castañeda A, Mcewen J, Hidalgo M, Castañeda E. Evaluación de varias técnicas de extracción de ADN de *Cryptococcus* spp. a partir de muestras ambientales. Biomédica 2004; 24: 324-331.

50 Granados D, Castañeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. FEMS Yeast Res 2006; 6: 636-644.

51 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 genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. FEMS Yeast Res 2006; 6: 4, 625-635.

52 Curtis F. Contribution a l'étude de la *saccharomycose* humaine Ann. Inst. Pasteur 1896; 10: 449-468.

53 Vanbreuseghem R, Takashio M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol 1970; 50: 6, 695-702.

54 Benham R. Cryptococci — their identification by morphology and by serology. J Infect Dis 1935; 57: 255–274.

55 Emmons, C. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil J Bacteriol 1951; 62: 685-690

56 Kwon-Chung KJ. A new genus, Filobasidella the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia 1975;67: 11997-11200.

57 Diaz J. Criptococcoma in the central nervous system of a non-inmmunocompromised patient. Rev Neurol 2008; 46: 97-101.

58 Casadevall A, Perfect J. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, D.C 1998. ISBN 1-5581-107-8, 407-456

59 Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concept supports one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res 2006; 6: 574-587.

60 Steenbergen J, Casadevall A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and *Cryptococcus*

neoformans var. *grubii* (serotype A) isolates in New York City. J Clin Microb 2000; 38: 1974–1976.

61 Chen S, Sorrell T, Nimmo G. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Clin Infect Dis 2000; 3:2, 499–508.

62 Nishikawa M, Lazera M, Barbosa G. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. Clin Microbiol 2003; 41: 1, 73–77.

63 Viviani M, Cogliati M, Esposto M. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. FEMS 2006; 6:614–619.

64 Chen J, Varma A, Diaz M, Litvintseva A, Wollenberg K, Kwon-Chung K. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerg Infect Dis 2008; 14: 755–762.

65 Capoor M, Mandal P, Deb M, Aggarwal P, Banerjee U. Current scenario of Cryptococcosis and antifungal susceptibility pattern in India: a cause for reappraisal. Mycoses 2008; 51: 258–265.

66 Bovers M, Hagen F, Kuramae E, Diaz M, Spanjaard L, Dromer F, et al. Unique hybrids between fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. FEMS Yeast Res 2006; 6:599– 607.

67 Kidd S, Bach P, Hingston A. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada. Emerg Infect Dis 2007; 13:51-57.

68 Hagen F, Assen S, Luijckx G, Boekhout T, Kampinga G. Activated dormant *Cryptococcus gattii* infection in a Dutch tourist who visited Vancouver Island (Canada): a molecular epidemiological approach. Med Mycol 2010; 48:528-531.

69 Hagen F, Boekhout T. The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*. Mycopathologia 2010; 170:209-211.

70 Chowdhary A, Randahawa H, Boekhout T, Hagen F, Klaassen C, Meis J. Temperate climate niche for *Cryptococcus gattii* in Northern Europe. Emerg Infect Dis 2012; 18: 172–174.

71 Okamoto K, Hatakeyama S, Itoyama S. *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection in man, Japan, 2007. Emerg Infect Dis 2010; 16:1155–1157.

72 Gugnani H, Mitchell T, Litvintseva A. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of *Eucalyptus* trees in India. Med Mycol 2005; 43: 565-569.

73 Grover N, Nawange S, Naidu J. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. Mycopathol 2007; 164: 159-170.

74 Callejas A, Ordoñez N, Rodríguez MC. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. Med Mycol 1998; 36: 341-344.

75 Lazera M, Cavalcanti M, Trilles L, Nishikawa M, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*—evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. Med Mycol 1998; 36:119–122.

76 Ellis D. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. J Clin Microbiol 1987; 25:430–431.

77 Montagna M, Viviani M, Pulito A, Aralla C, Tortorano A, Fiore L. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Italy. Note II. Environmental investigation related to an autochthonous clinical case in Apulia. J Mycol Med 1997; 7:93–96.

78 Mitchell T and Perfect J. Cryptococcosis in the era of AIDS- 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995; 8:515-548.

79 Lizarazo J, Rodríguez M, Ordóñez N, Vargas J, Castañeda E. Criptococosis meníngea en el Hospital Erasmo Meoz de Cúcuta. Acta Med Colomb 1995; 18:229-230.

80 Brizendine K, Baddley J, Pappas P. Pulmonary Cryptococcosis. Semin Respir Crit Care Med 2011; 32:727-734.

81 Padilla M, Navarrete G, Perez S, Villanueva T, Alfaro P. Criptococosis diseminada asociada con VIH. Dermatol Rev Mex 2012; 56:2, 126-131.

82 Desalermos A, Kourkoumpetis T, Mylonakis E. Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis. Expert Opin Pharmacother 2012; 13: 783-789.

83 Ecevit I, Clancy C, Schmalfuss I. The poor prognosis of central nervous system Cryptococcosis among nonimmunosuppressed patients: a call for better disease recognition and evaluation of adjuncts to antifungal therapy. Clin Infect Dis 2006; 42:1443-1447.

84 Rodríguez M, Vacarezza M, Savio E. Meningitis por *Cryptococcus neoformans*- Experiencia clínica y consideraciones terapéuticas. Rev Panam Infectol 2004; 6: 34-40.

85 Shen C, Cheng W, Yang M. Isolated intramedullary cryptococcal granuloma of the conus medullaris: case report and review of the literature. Scand J Infect Dis 2006; 38:562-565.

86 Gómeza M, Coboa M, Álvareza M, Sánchez J, Arribasb M. Celulitis necrotizante como primera manifestación de una criptococosis diseminada. Actas Dermosifiliogr 2011; 102:29729-29739.

87 Posada C, De-la-Torre C, González B, Cruces M. Criptococosis cutánea primaria en paciente oncológico siguiendo un patrón esporotricoide. Actas Dermosifiliogr 2009; 100:77-83.

88 Neuville S, Dromer F, Morin O, Du pont B, Ronin O, Lortholary O. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. Clin Infect Dis 2003; 36:519-523.

89 Perfect J, Dismukes W, Dromer F, Goldman D, Graybill J, Hamill R. Sorrell T. 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.

90 Vázquez O, Martínez I, Campos T. Criptococosis. Historia natural y estado actual del tratamiento. Acta Pediatr Mex 2005; 26:18-28.

91 Yuen C, Graziani A, Pietroski N, Macgregor R, Schuster M . Antigenemia criptocócica en pacientes infectados por el VIH (resumen 93) Clin Infect Dis1994; 19: 579-0000.

92 Liechty CA, Solberg P, Fueron W, et al . Asintomática suero antigenemia criptocócica y la mortalidad temprana durante la terapia antirretroviral en las zonas rurales de Uganda Trop Med Int Salud 2007; 12: 929-35.

93 Xiaorong L, Joseph H. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. Ann Rev Microbiol 2006;60: 69-105.

94 Casadevall A, Steenbergen J, Nosanchuk J. Ready made virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi-the *Cryptococcus neoformans* paradigm. Curr Opin Microbiol 2003; 6:4, 332-337.

95 Sánchez A, Escandón P, Castañeda E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. Rev Iberoam Micol 2008; 25:145-149.

96 McFadden D. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell 2007; 6: 1464-1473.

97 Bose I, Reese A, Ory J, Janbon G, Doering T. A Yeast under Cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell 2003; 2: 655–663.

98 Huffnagle G. Chen B, Curtis, J, Donald M, Trieter R, Toews G. Down regulation of the afferent phase of T cell mediated pulmonary inflammation and immunity by high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. J Immunology 1995; 155: 3507-3516.

99 Rodríguez M. Nakayasu E, Oliveira D, Nimrichter L, Nosanchuk J, Almeida I, et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. Eukaryotic Cell 2008; 7:58–67.

100 Perfect J. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45: 395–404.

101 D'Souza C, Heitman J. It infects me, it infects me not: Phenotypic switching in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. J Clin Invest 2001; 108: 1577-1578.

102 Fries B, Casadevall A. Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. J Infect Dis 1998; 178:1761-1766.

103 Kozel T. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans.* Trends Microbiol 1995;3(8): 295-299

104 Li SS, Mody C. *Cryptococcus*. Proc Am Thorac Soc 2010; 7:186-196.

105 Halliday C, Carter D. Clonal Reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. J Clin Microbiol 2003; 41:703-711.

106 Steenbergen, J. N. and A. Casadevall. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Microbes Infect 2003; 5: 667-675.

107 Lengeler, K. B., G. M. Cox, et al. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. Infect Immun 2001; 69: 1, 115-122.

108 Alspaugh, J. A., R. C. Davidson, et al. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. Contrib Microbiol 2000; 5: 217-38.

109 Cook S, McArthur J. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. Virulence 2013; 4:350–353.

110 Miyata S, Casey M, Frank D, Ausubel F, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Infect Immun 2003; 71: 2404–2413.

111 Morton D, Barnett R, Chadwick J. Structural alterations to Proteus mirabilisas a result of exposure to haemolymph from the larvae of *Galleria mellonella*. Microbios 1984; 39: 177–185.

112 Leuko S, Raivio T. Mutations that impact the enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx envelope stress response attenuate virulence in *Galleria mellonella*. Infect Immun. 2012; 80:3077-3085.

113 Jander, G., L. G. Rahme, and F. M. Ausubel. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. J. Bacteriol 2000; 182:3843-3845.

114 Brennan M, Thomas D, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 34: 153–157.

115 Mesa A, Forastiero A, Bernal L, Cuenca M, Mellado E, Zaragoza O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen Candida tropicalis and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. Med Mycol 2013;51:461–472

116 García R, Casadevall A, Rodríguez J, Cuenca M, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. PLoS One 2011 6:e24485.

117 Thomaz L, Garcia-Rodas R, Guimaraes A, Taborda C, Zaragoz, O, Nosanchuk J. D. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. Virulence 2013; 4: 2,139-146.

118 Firacative C, Shuyao D, Meyer W. *Galleria mellonella* Model Identifies Highly Virulent Strains among All Major Molecular Types of *Cryptococcus gattii*. PLoS One. 2014; 9 : 8, e1050576.

119 Chen S, Brownlee A, Sorrell T. Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in patients with AIDS or other immunosuppressive conditions. J Infect Dis 1996; 173: 3, 754.

120 Sorrell T, Chen S, Ruma P. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J Clin Microbiol 1996; 34: 1253-1260.

121 Trilles L, Lazéra S, Wanke B, Vasconcelos R, Martins N, Penarrieta B. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103: 455-462.

122 Mycosis. Oral Abstracts. Diagnosis and Prophylaxis of Fungal Diseases 2014.

123 Walraven CJ, Gerstein W, Hardison SE, Wormley F, Lockhart SR, et al. Fatal disseminated *Cryptococcus gattii* infection in New Mexico. PLOS ONE 2011; 6: e28625.

124 Chowdhary A, Prakash A, Randhawa HS, Kathuria S, Hagen F, et al. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. Mycoses 2013; 56: 222–228.

125 Litvintseva, A, Thakur R., Reller L, Mitchell T. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. J Infect Dis 2005;192:5, 888-892.

126 Powderly W. Cryptococcal meningitis and AIDS. Clin Infect Dis 1993; 17: 837-842.

127 Hakim J, Gangaidzo I, Heyderman R. Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. AIDS 2000; 14: 1401–1407.

128 Holmes C, Losina E, Walensky R, Yazdanpanah Y, Freedberg K Review of human immunodeficiency virus type 1-related opportunistic infections in sub-Saharan Africa J Infect Dis 2003; 36: 652–662.

129 Mofenson L, Oleske J, Serchuck L, Van Dyke R, Wilfert C. Treating opportunistic infections among HIV-exposed and infected children, recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the Infectious Diseases Society of America. MMWR 2004; 53: 1-63.

130 Lazéra M, Gutierrez M, Cavalcanti M, Wanke B. Criptococose. In: JR Coura (ed.), Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2005:1223-1236.

131 Lizarazo J, Escandon P, Agudelo C, Castañeda E. Cryptococcosis in Colombian children and literature review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014; 109: 797-804.

132 Mirza S, Phelan M, Rimland D. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992–2000. J Infect Dis 2003; 36:789–794.

133 Jarvis J, Meintjes G, Harrison T. Outcomes of cryptococcal meningitis in antiretroviral naive and experienced patients in South Africa. J Infect 2010; 60: 496-498.

134 Cohen J, Powderly W G. Cryptococcosis. En Infectious Diseases, 2nd edition. New York NY, Elsevier 2004; 2353-2357.

135 Kuang-Wen O, Kuo-Feng H, Yeung-Leung C, Giu-Cheng H, Huan-Ming H, Jyh-Cherng Y. Asymptomatic pulmonary nodules in a patient with early-stage breast cancer: *Cryptococcus* infection. J Infect Dis 2010; 14:1, 77-80

136 Kontoyiannis D, Peitsch W,Reddy B, Whimbey E, Han Y, Bodey G, et al Cryptococcosis in Patients with Cancer. CID 2001; 32:1, 147-150.

137 Krockenberger M. Canfield P, Malik R. *Cryptococcus neoformans* in the Koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by C. *gattii* and investigation of environmental sources. Med Mycol 2002; 40:263-272.

138 Malik R, krockenberger B, Cross G, Doneley R, et al. Avian cryptococosis. Med Mycol 2003; 41:115-124.

139 Baro T, Torres J, Hermoso de Mendoza M, Morera Y, AlÍa C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. J. Clin. Microbiol 1998; 36:458–461.

140 McGill S, Malik R, Saul N, Beetson S, Secombe C, Robertson I, Irwin P. Cryptococcosis in domestic animals in Western Australia: a retrospective study from 1995-2006. Med Mycol 2009; 47:625-639.

141 Litvintseva A, Carbone I, Rossouw J, Thakur R, Govender N, Mitchell T. Evidence that the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* may have evolved in Africa. PLoS ONE 2011; 6:5.

142 Soberón, J. Nakamura M. Niches and distributional areas: Concepts, methods, and assumptions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106: 19644-19650.doi:10.1073/pnas.0901637106.

143 Soberón, J. Niche and area of distribution modeling: a population ecology perspective. Ecography 2010; 33: 159-167. doi: 10.1111/j.1600-0587.2009.

144 Peterson A. Predicting species geographic distributions based on ecological niche modeling. Condor 2001; 103:599–605.

145 Stockwell D, Peterson A. Effects of sample size on accuracy of species distribution models. Ecol Model 2002; 148:1–13

146 Stockwell D, Peters D. The GARP modelling system: problems and solutions to automated spatial prediction. Int J Geogr Inform Sci 1999; 13:143–158.

147 Fisher M, Hanage W, De Hoog S, Johnson E, Smith M, White N, et al. Low effective dispersal of asexual genotypes in heterogeneous landscapes by the endemic pathogen *Penicillium marneffei*. PLoS Pathog 2005; 1:2, e20.

148 Baptista RC, Hinojosa A, Riquelme M. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western North American deserts. Ann N Y Acad Sci.2007; 1111:35-46.

149 Lizarazo J, Mendoza M, Palacios D, Vallejo A, Bustamante A, Ojeda E, et al. (2000). Criptococosis ocasionada por *Crytococcus neoformans* variedad *gatti*. Acta Med Colomb 2000; 4:171-178.

150 Castañeda E, Lizarazo J. Protocolo de estudio y manejo de los pacientes con criptococosis. Infectio. 2012;16(Supl 3): 123-125

151 Lizarazo J, Catañeda E. Consideraciones sobre la criptococosis en los pacientes con sida. Acta Med Colomb 2012; 37: 49-61.

152 Escandón P, Lizarazo J, Agudelo C, Chiller T, Castañeda E. Evaluation of a rapid lateral flow immunoassay for the detection of cryptococcal antigen for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV patients in Colombia. Med Mycol 2012; 51:7, 765-768.

153 Lizarazo J. Escandon P, Agudelo C, Firacative C, Meyer W, Castañeda 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: 10.1371/journal.pntd.0003272

154 Escandón P, Huérfano S, Castañeda E. Inoculación experimental de Terminalia catappa con un aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C. Biomédica 2002; 22:524-528.

155 Huérfano S, Caridad M, Castañeda E. Caracterización fenotípica de aislamientos ambientales de *Cryptococcus neoformans*. Biomédica 2003; 23:328-340.

156 Escandón P, Sanchez A, Firacative C, Castañeda E. Isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII, from *Corymbia ficifolia* detritus in Colombia. Med Mycol 2010; 48: 675–678.

157 Casali A, Goulart L, Silva L, Ribeiro A, Amaral A, Meyer W, et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. FEMS Yeast Res 2003; 3: 405-415.

158 Manual de técnicas convencionales para el estudio de la ecología y biología molecular de Hogos de importancia clínica. Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud código MNL-R03.3150-001.

159 Goldman D, Fries B, Casadevall A. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neofomans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. Proc Nat Acad Sci 1998; 95:14967-14972.

160 Fries B, Goldman D, Cherniak R, Ju R, Casadevall A. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucoronoxylomannan structure. Infect Immun 1999; 67:6076-6083.

161 Halliday CL, Bul T, Krockenberger M, Malik R, Ellis D, Carter D. Presence of α and a Mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. J Clin Microbiol 1999; 37:2920-2926.

162 Yan Z, Lee X, Xu J. Geographic distribution of mating types alleles of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. J Clin Mircrobiol 2002; 40:965-972.

163 Chau T, Mai N, Phu N, Nghia H, et al. A prospective descriptive study of cryptococcal meningitis in HIV uninfected patients in Vietnam - high prevalence of *Cryptococcus*

neoformans var *grubii* in the absence of underlying disease. BMC Infect Dis 2010; 10: 199-210

164 Laurenson IF, Trevett AJ, Lalloo DG, Nwokolo N, Naraqi S, et al. Meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and var. *neoformans* in Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90: 57–60.

165 Seaton RA, Verma N, Naraqi S, Wembri JP, Warrell DA. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91: 44–49.

166 Laurenson I, Naraqi S, Howcroft N, Burrows I, Saulei S. Cryptococcal meningitis in Papua New Guinea: ecology and the role of eucalypts. Med J Aust. 1993; 158(3):213.

167 Ellis D, Pfeiffer T. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. Eur j epidemiol 1992;8:321-325

168 Tay ST, Rohani MY, Hoo TS et al. Epidemiology of cryptococcosis in Malaysia. Mycoses 2010; 53: 509–551.

169 Kidd S, Chow Y, Mak S, Bach P, Chen H, Hingston A, et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 1433-1443

170 Jukes T.H. and Cantor C.R. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, Mammalian Protein Metabolism, Academic Press, New York 1969: 21-132.

171 Beale A, Sabiiti W, Robertson E, Fuentes K, O'Hanlon S, Jarvis J, et al. Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. PLoS Negl Trop Dis, 2015; 9: 6, e0003847.

172 Byrnes EJ, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. PLoS Pathog. 2010; 22;6:4, e1000850

173 Galanis E, Macdougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. Emerg Infect Dis 2010; 16: 251–257

174 Kaocharoen S, Ngamskulrungroj P, Firacative C, Trilles L, Piyabongkarn D, et al. Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst isolates of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex in Thailand. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 4:7, e2297.

175 Dou HT[1], Xu YC, Wang HZ, Li TS.Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using multilocus sequence typing and the DiversiLab system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34:4, 753-762

176 Wyka M, Govendera N, Mitchellc T, Litvintsevac A Multilocus sequence typing of serially collected isolates of *Cryptococcus* from HIV-infected patients in South Africa. J Clin Microbiol 2014; 52:6, 1921-1931

177 Desnos-Ollivier M, Patel S, Raoux-Barbot D, Heitman J, Dromer F. Cryptococcosis serotypes impact outcome and provide evidence of *Cryptococcus neoformans* speciation. Mbio 2015; 6:3, e00311-15

178 Khayhan K, Hagen F, Pan w, Simwami s, Fisher M, Wahyuningsih R, et al. Geographically structured populations of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in Asia correlate with HIV status and show a clonal population structure PLoS One. 2013; 8:9, e72222.

179 Danesi P, Firacative C, Cogliati M, Otranto D , Capelli G, Meyer W. Multilocus Sequence Typing (MLST) and M13 PCR fingerprinting revealed heterogeneity amongst

Cryptococcus species obtained from Italian veterinary isolates. FEMS Yeast Res 2014; 14: 897–909

180 Cogliati M, Zamfirova RR, Tortorano AM, Viviani MA. Molecular epidemiology of Italian clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates. Med Mycol 2013; 51:499 – 506.

181 Choi YH, Ngamskulrungroj P, Varma A, Sionov E, Hwang SM, Carriconde F, Meyer W. Prevalence of the VNIc genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV-associated cryptococcosis in the Republic of Korea. FEMS Yeast Res 2010; 10:769 –778.

182 Wiesner DL, Moskalenko O, Corcoran JM, McDonald T, Rolfes MA, Meya DB, et al. Cryptococcal genotype influences immunologic response and human clinical outcome after meningitis. mBio 2012; 3:e00196 –12.

183 Singer L, Meyer W, Firacative C, Thompson G, Samitz E, Sykesf J. Antifungal drug susceptibility and phylogenetic diversity among *Cryptococcus* isolates from dogs and cats in North America. J Clin Microbiol 2014; 52:6, 2061-2070

184 Mihara T1, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungroj P, Umeyama T, Takazono T. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. Med Mycol. 2013; 51:3, 252-260.

185 Umeyama T1, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. Jpn J Infect Dis. 2013; 66: 1,51-55.

186 Hwa Y, Ngamskulrungroj P, Varma A, Sionov E, Myung S, Carriconde F. Prevalence of the VNIc genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in the Republic of Korea. FEMS Yeast Res. 2010; 10: 6, 769–778.

187 Lockhart S, Iqbal N, Harris J, Grossman N, DeBess E, Wohrle R. *Cryptococcus gattii in* the United States: genotypic diversity of human and veterinary isolates. PLoS ONE 2013;8:9, e74737.

188 Engelthaler D, Hicks N Gillece, J Roe C, Schupp J, Driebe E. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. mBio. 2014; 5:4, e01464-14.

189 Carriconde F, Gilgado F, Arthur I, Ellis D, Malik R, van de Wiele N. Clonality and α-a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population--an emerging outbreak in Australia. PLoS One. 2011: 24;6: 2,e16936.

190 Nielsen K, Cox GM, Wang P, Toffaletti DL, Perfect JR, Heitman J. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic a and alpha isolates. Infect Immun. 2003;71:4831–4841

191 Kwon-Chung KJ, Edman JC & Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1992; 60: 602–605

192 Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. PNAS. 2001; 98: 15245–15250

193 Zaragoza O1, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans.* Adv Appl Microbiol. 2009;68:133-216

194 Fraser J, Giles S, Wenink E, Geunes s, Wright J, Diezmann S. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. J. Nature. 2005; 437:7063, 1360-1364.

195 Wang, C. S., Z. Z. Li, and T. M. Butt. Molecular studies of co-formulated strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. J Invertebr Pathol 2002; 80:29-34.

196 Kimura, M., L. Kaufman, S. Maekura, K. Teramura, T. Satou, and S. Hashimoto. Pulmonary cryptococcosis due to a capsule-deficient strain confused with metastatic lung cancer. Mycopathologia 2007; 140:65-68

197 Laurenson I, Ross J, Milne L. Microscopy and latex antigen negative cryptococcal meningitis. J Infect. 1998; 36: 3, 329-331.

198 Moser, S. A., L. Friedman, and A. R. Varraux.. Atypical isolate of *Cryptococcus neoformans* cultured from sputum of a patient with pulmonary cancer and blastomycosis. J Clin Microbiol 1978; 7:316-318.

199 Ro, J. Y., S. S. Lee, and A. G. Ayala. Advantage of Fontana-Masson stain in capsule-deficient cryptococcal infection. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:53-57.

200 Harding, S. A., W. M. Scheld, P. S. Feldman, and M. A. Sande.. Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 1979; 382:113-118.

201 Salkowski, C. A., and E. Balish. Susceptibility of congenitally immunodeficient mice to a nonencapsulated strain of *Cryptococcus neoformans*. Can J Microbiol 1991; 37: 834-839.