

Cartas al Director

Caracterización molecular de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* causante de brotes epidémicos de criptococosis en cabras

Sr. Director,

Entre 1990 y 1994, en la provincia de Cáceres (España), se produjeron varios brotes de neumonía grave asociada a caquexia que afectó un número variable de cabras -entre el 2,5 y el 12% de las integrantes de los rebaños-. En algunos casos también existía una afectación encefálica y hepática y se registró una elevada tasa de mortalidad de los animales enfermos [1]. La identificación de aislados obtenidos por necropsia de animales, en cinco de los brotes, demostró que el agente etiológico era una levadura capsulada, identificada como *Cryptococcus neoformans*. Posteriormente el análisis bioquímico y serológico de 13 cepas aisladas de seis cabras, que se habían conservado en la colección de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, permitió comprobar que correspondían al serotipo B de la variedad *gattii* [2].

La demostración de que *C. neoformans* var. *gattii* existe en nuestro país, y que es capaz de ocasionar infecciones graves en animales sin otras patologías previas, constituye un hallazgo destacable que enriquece la información referida a la epidemiología de la criptococosis.

Para caracterizar las cepas aisladas se procedió a un análisis molecular utilizando la técnica del *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Para ello se efectuó la extracción del ADN de todos los aislamientos mediante la técnica de Lehmann *et al.* [3] modificada. Se efectuó una amplificación por PCR siguiendo la técnica de William *et al.* [4] con cuatro diferentes cebadores: CN1 (5'TACCCCGCCCATATTCCAT3'), 5SOR (5'ATGGGAATAC-GACGTGCTGTAG 3'), C1 (5'ACGGTACTACT 3') y C3 (5'GTTTCCGCCCC 3'), estos dos últimos se emplearon de forma simultánea. Para la amplificación se utilizó un termociclador (Perkin-Elmer Cetus, EE.UU.) realizándose 40 ciclos y el material obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio. Después de una detallada observación visual, las imágenes se escanearon para ser procesadas en el sistema computarizado GEL DOC 1000, Molecular analysis (Bio-Rad Laboratories, California USA). Se determinó el tamaño molecular de los fragmentos de ADN amplificados. La repetitividad de la técnica se confirmó por la amplificación del ADN de un mismo organismo en tres ocasiones diferentes. Los fragmentos de dudosa interpretación no fueron asumidos como elementos de discriminación de los patrones [5,6].

Los datos proporcionados por el análisis de imagen han permitido agrupar las cepas con idéntico perfil electroforético en dos diferentes patrones genotípicos que han sido denominados arbitrariamente A y B.

Cuando se disponía de dos aislamientos de un mismo animal, el patrón genómico fue el mismo. El patrón A ha sido el dominante puesto que en todos los brotes se ha demostrado la presencia del mismo; sin embargo, en uno de los episodios ocurrido en la localidad de Vera, en que fue posible disponer de varias cepas aisladas de dos animales diferentes, se encontró el segundo patrón, o B (Tabla 1).

Estos resultados sugieren que, con la metodología utilizada, se ha demostrado que en las diferentes zonas de Cáceres donde tuvieron lugar los brotes epidémicos, existe un tipo dominante de *C. neoformans* var. *gattii*, sin embargo esta cepa coexiste en la misma área por lo menos con otro tipo genómico.

Los resultados obtenidos, plantean diversas incógnitas como la de determinar el nicho ecológico de esta especie en la naturaleza en Cáceres y en otras partes de la península ibérica y conocer la diversidad genética de las mismas, para poder relacionarla con la capacidad infectiva de esta especie.

Tabla 1. Distribución de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* obtenido de la necropsia de cabras afectadas de criptococosis y el patrón genómico de las mismas determinado utilizando el *Random Amplified Polymorphic DNA*.

Animal	Cepas	Muestra	Localidad	Cebador utilizado			Patrón
				CN1	5SOR	C1+C3	
1	48 A	Pulmón	Pescueza	III	I	VI	A
1	49 A	Pulmón	Pescueza	III	I	VI	A
2	50 A	Pulmón	Serradilla	III	I	VI	A
2	60 A	Pulmón	Serradilla	III	I	VI	A
3	51 A	Hígado	Casas de Millan	III	I	VI	A
3	52 A	Encéfalo	Casas de Millan	III	I	VI	A
4	58 A	Pulmón	Madroñera	III	I	VI	A
4	59 A	Pulmón	Madroñera	III	I	VI	A
5	56 A	Intestino	Vera	IV	II	V	B
6	53 A	Pulmón	Vera	III	I	VI	A
6	54 A	Pulmón	Vera	III	I	VI	A
6	55 A	Pulmón	Vera	III	I	VI	A
6	57A	Pulmón	Vera	III	I	VI	A

Bibliografía

- Torres-Rodríguez JM, Baró T, Hermoso de Mendoza M, Morera Y, Alía C. Primeros aislamientos autóctonos de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en España. Rev Iberoam Micol 1997; 14:36.
- Baró T, Torres-Rodríguez JM, 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; 36:458-463.
- Lehmann P, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using Random Amplified Polymorphic DNA. J Clin Microbiol 1992; 30:3249-3254.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. ADN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990; 18:6531-6535.
- Sorrell TC, Chen CA, Ruma P, et al. 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.
- Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. J Clin Microbiol 1997; 35:1332-1336.

Josep M Torres-Rodríguez, Teresa Baró, Yolanda Morera, Concepción Alía, Olga López y Miguel Hermoso de Mendoza¹

Grup de Recerca en Micologia Experimental i Clínica (GREMEC), IMIM, Universitat Autònoma de Barcelona, Avda. Dr. Aiguader, 80, 08003 Barcelona, España, E-mail: jmtorres@imim.es y ¹Departamento de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, España