
Diversidade de isolados clínicos de *Cryptococcus gattii* por *Multi-locus sequence typing* no Estado de São Paulo

Lucas Xavier BONFIETTI¹, Cau PHAM², Dayane Cristina SILVA³, Marilena dos Anjos MARTINS³, Shawn LOCKHART², Marcia de Souza Carvalho MELHEM³

¹Núcleo de Ciências Biomédicas-CLR Araçatuba-Instituto Adolfo Lutz

²CDC, Centers for Disease Control and Prevention - Atlanta, GA, EUA;

³Núcleo de Micologia-Centro de Parasitologia e Micologia-Instituto Adolfo Lutz

Levaduras do gênero *Cryptococcus* apresentam comportamento ubíquo e são responsáveis por causar infecções em mamíferos, especialmente em seres humanos. A criptococose é uma micose sistêmica, causada por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, que se distribui mundialmente e apresenta caráter endêmico no Nordeste do Brasil. A apresentação clínica da doença pode variar desde quadro pulmonar assintomático até meningoencefalite grave, podendo levar ao óbito a depender de fatores, como: carga fúngica inicial, imunidade do paciente e espécie do agente etiológico¹²

Até a década passada, acreditava-se que *Cryptococcus neoformans* era uma única espécie subdividida em quatro sorotipos A, D (*C. neoformans* var *neoformans* e var. *grubii*) B, C (*C. neoformans* var *gattii*), e um híbrido AD. Através da diferenciação fenotípica e genotípica esses agentes foram divididos em duas espécies: *C. neoformans* e *C. gattii*⁷. Posteriormente, Meyer e colaboradores em 1999 e 2003, por metodologias de DNA-Fingerprinting e PCR-RFLP, subdividiram as

espécies *C. gattii* e *C. neoformans* em quatro subtipos cada: VGI - VGIV e VNI - VNIV^{10,11}. As variáveis descritas apresentam semelhanças aos sorotipos descritos previamente, no entanto, sem total equivalência. Meyer e colaboradores (2009)⁹, a fim de uniformizar os métodos moleculares utilizados e para melhor compreender a epidemiologia dessa doença, publicaram um consenso sobre *Multi-locus sequence typing* (MLST) e *Cryptococcus*. As ferramentas moleculares levaram à análise mais precisa dos subtipos e permitiram associações com virulência, perfis de resistência e distribuição geográfica^{1,2,4,5,6,9 e 13}.

O objetivo desse trabalho foi estudar isolados clínicos de *C. gattii* no estado de São Paulo com vistas a aprimorar o conhecimento sobre a diversidade genética desse agente.

Em colaboração com *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC-Atlanta, GA, EUA) foram analisados por técnica de MLST, 56 isolados clínicos de *C. gattii* (sendo isolado 1 por paciente) obtidos da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo, abrangendo o período de 1994-

2012. Os isolados foram purificados e plaqueados em ágar de extrato de levedura-peptona dextrose (YPD) adicionados de 0,5% de NaCl a partir das culturas liofilizadas. Os DNAs foram extraídos usando-se *kit* UltraClean (MO BIO *Laboratories*). A técnica molecular de MLST utilizando os genes dos *loci* 7 (CAP59, URA5, IGS1, PLB1, SOD1, GPD1, LAC1) foi realizada de acordo com o respectivo Consenso, assim como o sequenciamento dos 7 genes utilizando “Big Dye terminator”⁹. Os resultados foram comparados no banco de dados (<http://mlst.mycologylab.org>). Os produtos do sequenciamento foram compilados e analisados nos programas *BioEdit* e *Sequencher*. A árvore filogenética foi construída utilizando-se o programa MEGA 5.0.

Foram observadas mutações correspondendo a novos alelos nos genótipos VGI e VGII foram observadas. Para o tipo molecular VGI, ainda que, apenas 4 isolados tenham sido estudados, um novo alelo foi observado para o gene SOD. Para o tipo molecular VGII, foram observados 12 alelos inéditos, que não estavam presentes no banco de dados do MLST. Dentre estes, foram identificados 4 novos alelos para o gene IGS1, 3 novos alelos para o gene CAP59, 2 novos alelos para PIB 1 e SOD1 e um novo alelo para PLB1. Não foram encontrados novos alelos para os genes LAC1 e URA5.

Dos 56 isolados compreendidos nesse estudo, 21 (37,5%) apresentaram STs que, até então, não estavam incluídos nas bases de dados (ST300-319 e ST325), sendo que, a configuração de um novo ST pode ser gerada por novos alelos ou por uma nova combinação de alelos, previamente, conhecidos.

Foram identificados 3 grandes grupos, sendo um deles de isolados VGI (4 isolados) e 2 grupos VGII (7 e 47 isolados). Os resultados deste estudo demonstraram grande diversidade de STs, ao contrário dos encontrados em estudos realizados na Austrália e EUA, os quais indicaram baixa diversidade molecular, com grande número de cepas clonais dentre os entre isolados de *C. gattii* VGII^{3,5,8}. Os grupos clonais englobados no genótipo VGII descritos no estudo norte-americano foram subdivididos em VII *a*, *b* e *c*, dos quais apenas VGII *b* foi descrito em amostras provenientes da Austrália^{3,5}. A análise filogenética dos isolados analisados neste estudo revelou um único isolado clonal de VGII *a* e apenas isolados com perfis genéticos similares aos de VGII *b* e *c*. Apesar da ausência de genótipos VGII *b* e *c*, perfis moleculares semelhantes foram encontrados em isolados deste estudo.

Na figura 1 pode ser observada a árvore filogenética de todos os isolados, comparados com amostras-padrão dos genótipos já conhecidos VGII *a*, *b* e *c*. Grande diversidade genética na América do Sul foi, também, observada por Fraser e colaboradores que, embora estudando número menor de isolados, observaram alta heterogeneidade dentre os genótipos, com todos os perfis moleculares distintos entre si (7/7, 100%)⁵.

Este é o primeiro relato da ocorrência de um subtipo molecular com características de VGII *c* na América do Sul. O estudo mostrou, ainda, grande diversidade genotípica entre isolados de *C. gattii* no Estado de São Paulo. A correlação desses achados com fatores de virulência e resistência a antifúngicos motivam futuros estudos que contribuam para o conhecimento de um principais agentes da criptococose e sua importância clínica.

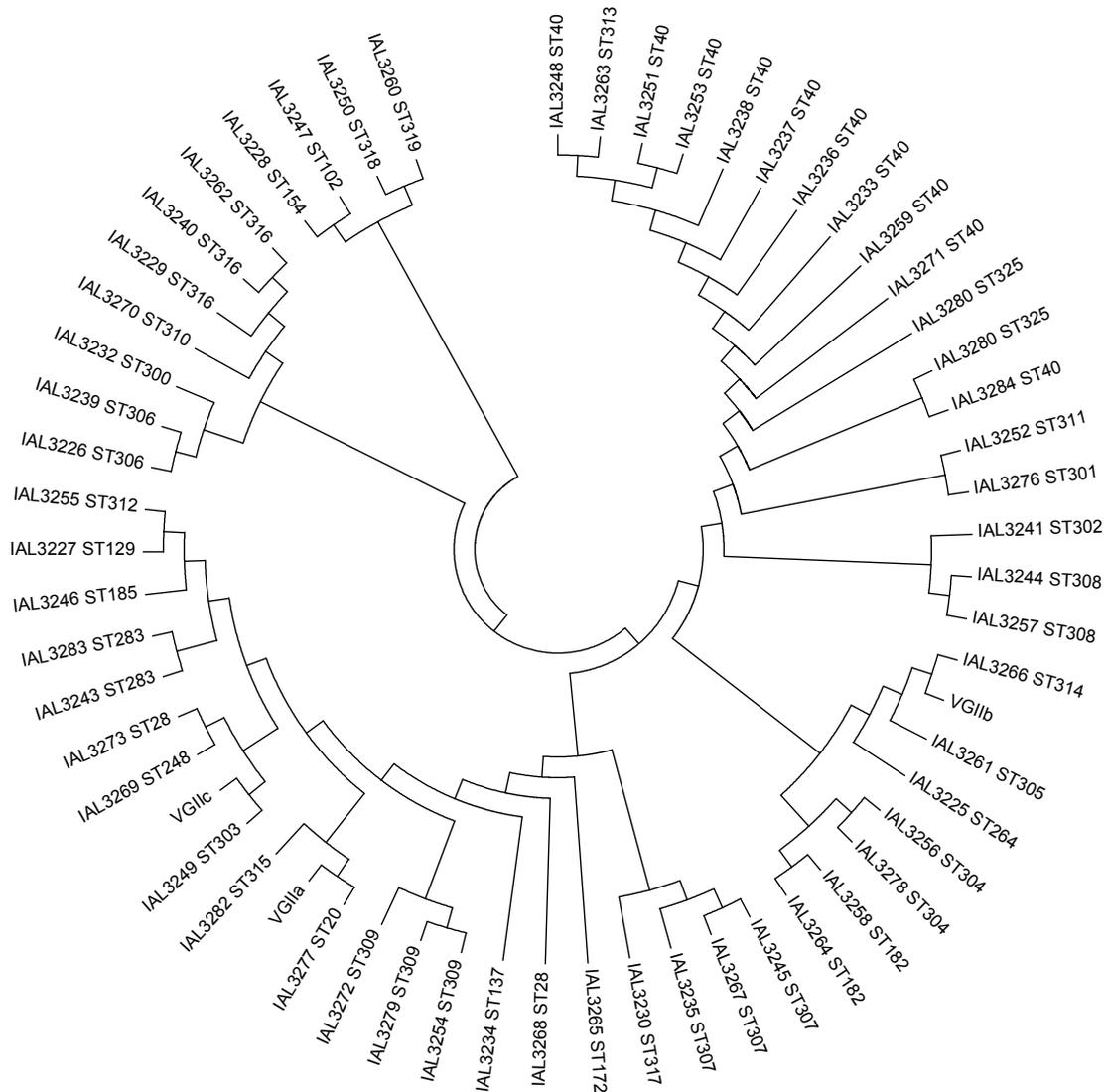


Figura 1. Árvore filogenética de 56 isolados clínicos de *C. gattii* e amostras-padrão de genótipos VGIIa, b e c (nos círculos)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boekhout T, Theelen B, Diaz M. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol* 2001; 147:891–907
2. Byrnes EJ, LI W, Lewit Y. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog* 2010, 6:e1000850.
3. Carriconde F, Gilgado F, Arthur I, Ellis D, Malik R, van de Wiele N, *et al.* Clonality and α -a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population—an emerging outbreak in Australia. *PLoS One* 2011, 6:e16936.
4. Datta K, Bartlett KH, Marr KA *Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 17258–17263.
5. Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 2005, 437:1360–1364.
6. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis

-
- outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:17258–63.
7. Kwon-Chung, K. J. and Varma, A., Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?. FEMS Yeast Research 2006, 6:574–587.
 8. Lockhart SR. Epidemiological cutoff values for triazole drugs in *Cryptococcus gattii*: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. Diagn Microbiol Infect Dis 2012, 73:144–148.
 9. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol 2009, 12:1–14.
 10. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofina M, Igreja RP, 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, 20:1790–9.
 11. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis 2003, 9:189–95.
 12. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2010, 50:291–322.
 13. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. Med Mycol 2012, 50:328–32.