

Ecología del *Cryptococcus neoformans* en Santa Fe

Vanni, Carlos; Sarsotti, Pedro V.; Ruatta, Jorgelina; García, Guillermo; Gutiérrez, César; Cabagna, Mariana

Cátedra de Parasitología y Micología - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral - Paraje "El Pozo" - 3.000 - Santa Fe- República Argentina - Tel.: 042-571138 - e-mail: sarsotti@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Se determinó que el hongo cosmopolita *Cryptococcus neoformans* habita, en la Ciudad de Santa Fe (República Argentina), en dos grandes zonas cercanas a cursos de agua (Puerto y costa del río Salado), con temperaturas entre los 20°C y los 25 °C de Octubre a Marzo, y entre los 6,4°C y 18,4°C en los meses de Abril a Octubre. Se procesaron heces frescas de palomas, sembrándolas en Agar Semilla de Girasol. Las colonias con pigmento pardo se identificaron, mediante las pruebas de la Ureasa, Feniloxidasas, asimilación de Inositol, inoculación en ratones albinos suizos y su examen micológico e histológico mediante el examen de cortes y cultivos de las vísceras.

SUMMARY: The cosmopolitan fungus *Cryptococcus neoformans* is found near waterways within two wide areas (Santa Fe city, Argentina) with temperatures ranging from 20°C to 25 °C during the warm season and 6,4°C to 18,4 °C during the cold season. Pigeon faeces were cultured on Sunflower Seed Agar. Brownish-grey colonies were identified using Urease, Fenylloxidase and Inositol assimilation test. At the same time, white mice were inoculated, tissue cut dyeings and viscera cultures having been carried out afterwards.

Introducción

La relación existente entre la paloma (*Columba livia*), y su papel como vector del hongo *Cryptococcus neoformans*, con distribución mundial, se ha puesto en evidencia mediante el estudio de las excretas (4, 23) depositadas en cornisas, altillos, galpones y criaderos de estas aves.

Las terapias con efectos inmunosupresores obran como causas predisponentes para la enfermedad fúngica por el *C. neoformans* (1, 7, 8) y su irrupción entre las enfermedades oportunistas (24) potencialmente fatales asociadas al SIDA (3, 4, 16, 17, 18, 19), ha llevado a la Criptococosis a ocupar el cuarto lugar entre estas últimas luego de *Pneumocystis carinii*, citomegalovirus y micobacterias. El conocimiento de esta realidad epidemiológica despertó la necesidad de contrastarla con valores obtenidos del medio ambiente local (25), y dado que el hongo se ha recobrado de una amplia variedad de climas, interesó conocer su distribución mediante un muestreo anual.

Materiales y Métodos

a).- Area de estudio: Ciudad de Santa Fe.

b).- Toma de Muestras: Se colectaron setenta y dos muestras de heces frescas, de veintidós palomares públicos y privados, a primera hora de la mañana y al abrigo del sol a fin de reducir la exposición a la radiación UV solar (2, 18). Se inclu-

yeron dieciocho muestras de tierra (2) exentas de heces frescas.

c).- Procesamiento de las muestras : 5 g de cada muestra se homogeneizaron con 20 ml de agua estéril adicionada de 0,50 ml de una solución de antibióticos (500.000 U de Colistina y 1,00 gr de Cloranfenicol en 50 ml de agua destilada), y se refrigeraron veinticuatro horas a 4°C, luego se sembró 0,10 ml del sobrenadante en la superficie del Agar Semilla de Girasol (ASG) colocado en caja de Petri. Dentro de los treinta días se observó diariamente a fin de hallar colonias cremosas color café, las que se repicaron en Agar Sabouraud Glucosado y se reservaron para su identificación.

d).- Identificación : se emplearon los siguientes ensayos,

- * Observación microscópica.
- * Crecimiento a 28°C y 37°C. (2, 10)
- * Producción de micelio pseudo-filamentoso en Agar de Arroz-Tween 80. (8)
- * Inducción de Tubos Germinativos. (2)
- * Auxanograma de Carbono y de Nitrógeno. (7, 8, 15)
- * Determinación de Ureasa en medio de Christensen. (27)
- * Producción de Feniloxidasas en medio ASG. (2, 21, 22)
- * Observación de cápsulas con Tinta China. (1)
- * Patogenicidad en ratones. (2, 3, 4, 31)

e).- Infección Experimental: Por cada cepa del hongo, se inocularon 0,50 ml de una suspensión

equivalente al grado 3 de la escala de Mac Farland por vía intraperitoneal, a cuatro ratones Albinos Suizos. A los quince días se los sacrificó y se extrajeron el cerebro, los pulmones e hígado, con los que se realizaron improntas para examinar, se sembraron en ASG y llevaron alicuotas a una solución de Formol al 10% v/v para efectuar cortes histológicos y coloraciones de Hematoxilina-Eosina, PAS y Alcian Blue (11, 13, 14, 29).

Resultados y Discusión

1) La provincia de Santa Fe ocupa 133.007 km² del Territorio Nacional. A lo largo de su eje norte-sur, el territorio santafesino tiene una longitud de 720 km. y en su eje este-oeste alcanza 380 km.

Todo el territorio es una extensa llanura de construcción o acumulación con inclinación noroeste-sureste. Su altura sobre el nivel del mar, característica de la inmensa llanura de la que forma parte, oscila entre los 10 y los 125 m. El territorio provincial se extiende en la zona templada, salvo áreas septentrionales menores de clima subtropical con estación seca (noroeste) y sin estación seca (noreste). Los vientos alisios, cálidos y húmedos que penetran en el territorio de la provincia desde el EN, ejercen una fuerte influencia sobre el clima, sobre todo en verano.

La Ciudad de Santa Fe está ubicada entre los Meridianos 59 y 63 y los Paralelos 28 y 34, 30" de latitud Sur, su Temperatura Media Anual varía de 17°C a 21°C; la Humedad Relativa Anual presenta una Máxima de 100%, Mínima: 24%, Media: 74,4%, Media Máxima: 90% y Media Mínima de 57%; y con 900 a 1.000 mm de Lluvia Anual, recibe una marcada influencia del río Paraná en las condiciones climáticas, atenuando sus características de mediterraneidad. Su Puerto situado a la altura del km 590 del Río Paraná y unido al mismo por un canal de acceso con profundidades operativas, presenta la particularidad casi única en el mundo de hallarse a 800 km del mar.¹

2) En las muestras de tierra no desarrollaron colonias del hongo, correspondiéndose con la bibliografía consultada en la que se cita como posibles causas a la radiación solar y la acción fagocitaria de especies de *Acanthamoeba* (2). En veinticinco muestras de heces se aisló el *Cryptococcus*

neoformans. Las cepas se distribuyeron en dos grupos, de acuerdo a la Temperatura ambiente del día de su muestreo, denominados:

1) Grupo Templado: "Mapa 1", y 2) Grupo Frio: "Mapa 2". Estos grupos determinaron dos zonas: una correspondiente al Grupo I, con temperaturas superiores a 20°C (de 20°C a 25°C) que abarca la zona céntrica y es aledaña al Puerto de la Ciudad; y otra al Grupo II con temperaturas inferiores a 20°C (de 6,4°C a 18,4°C) que se suma a la primera y que pertenece a la orilla del Río Salado.

3) La inoculación experimental en ratones (26, 31), de las cepas aisladas, resulta exitosa luego de tres (3) inoculaciones por vía intraperitoneal (con un intervalo de una semana cada una), recobrándose el hongo de las vísceras y también de los hemocultivos. Cuando se inocula por vía subcutánea, se produce a los pocos días un absceso localizado rico en células del hongo.

4) El número de Unidades Formadoras de Colonias en la Zona Fria presentan valores ligeramente inferiores a los de la Zona Templado, aunque se esperaba una disminución mayor, esto podría deberse a:

a) En los meses de Otoño e Invierno, la radiación solar es menor y también lo es el efecto esterilizante de los rayos UV.

b) La temperatura corporal de la paloma (30) de 42 °C jugaría un papel protector respecto de la temperatura ambiente de 10°C o menos.

c) Los palomares costeros están más expuestos a las condiciones climáticas que los palomares céntricos, justificándose un menor número de UFC.

5) De acuerdo a los Mapas 1 y 2, aparecen delimitados dos zonas con características ecológicas similares como:

a) Ambas pertenecen a zonas pobladas.

b) Elevado número de palomas.

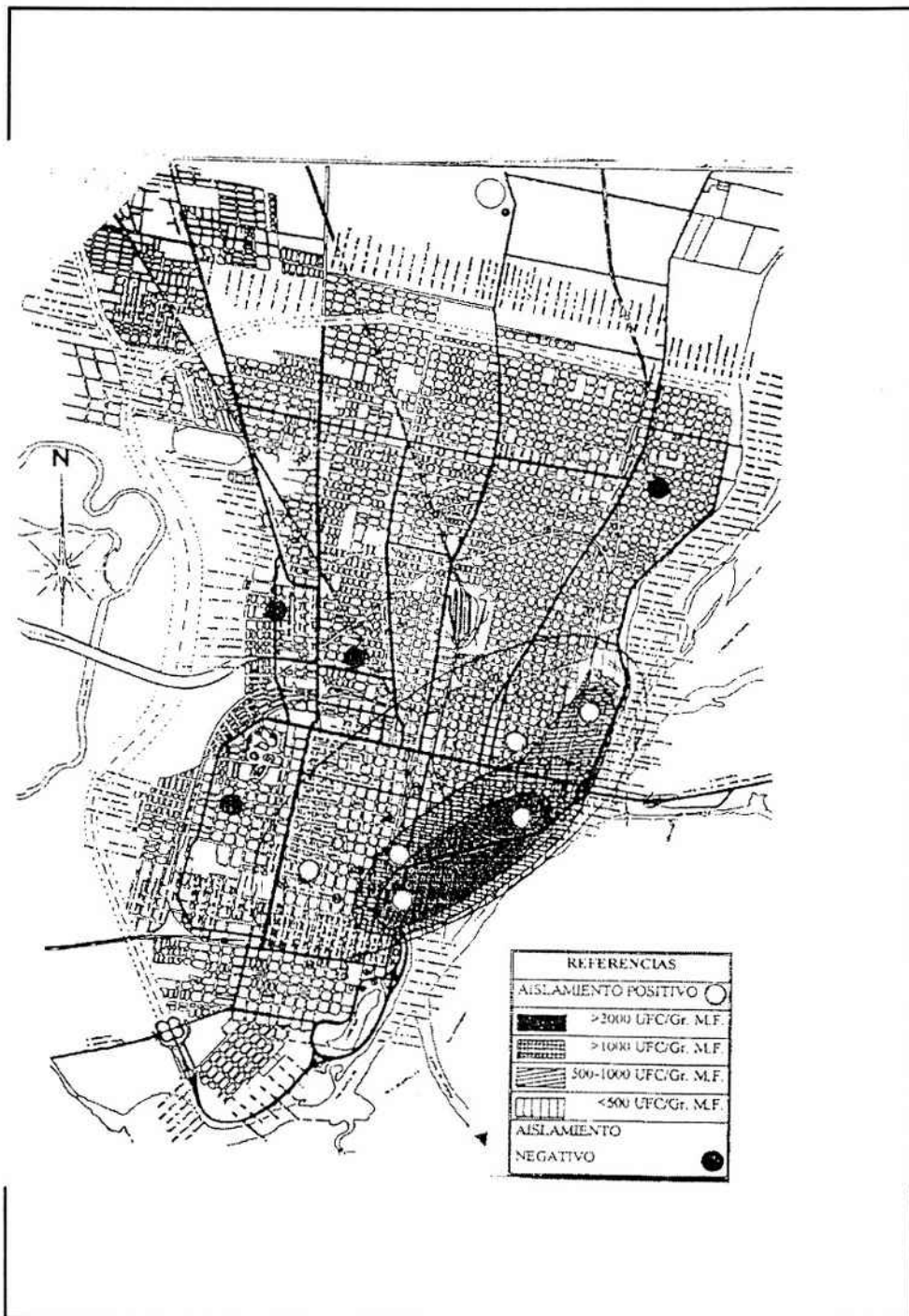
c) Cercanas a curso de agua.

Mientras que como características diferenciales entre ambas se puede citar:

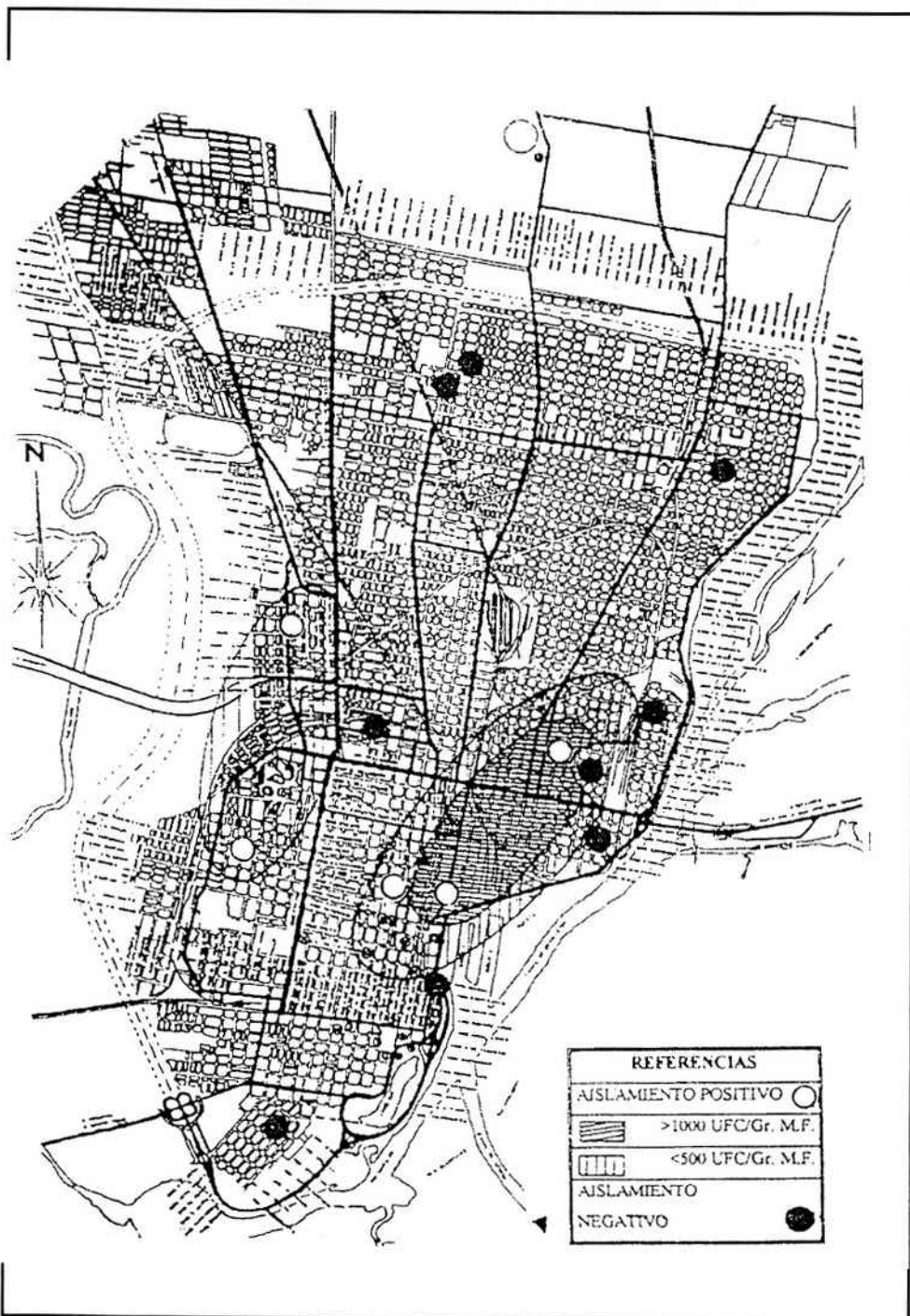
La Zona I, correspondiente al Mapa 1 es más céntrica, con mayor cantidad de edificios, campanarios, cornisas y reservorios urbanos, tiene como centro al Palomar Municipal con el mayor número de aislamientos, los que disminuyen concéntricamente a medida que el muestreo se aleja del mismo hacia los palomares privados. En el primero las palomas viven en libertad con un cuidado mínimo, mientras que en los privados permanecen el mayor tiempo en cautiverio y con un control casi individual. Se mencionan a palomas de vida libre que visitan los establecimientos colomófilos y que podrían

¹ Tomado de la página WWW de la UNL. - <http://unl.edu.ar/santafe/geograf.htm>

Mapa 1. Grupo Templado - Temperaturas entre 20° C y 25° C



Mapa 2. Grupo Frío - Temperaturas menores a 20° C



actuar como vectores del hongo y transmitirlo al resto de las aves, lo que debe tenerse en cuenta e implementar como medida profiláctica la cuarentena de las aves externas a fin de detectar la posible portación del hongo.

6) Es importante destacar la importancia del Medio Agar Semilla de Girasol (28) para el aislamiento diferencial primario del *Cryptococcus neoformans* en el cual sus colonias color café lo diferencian de las blancas de *Cándida spp.* y de las rosadas de *Rhodotorula spp.*, cuyo empleo junto a las pruebas bioquímicas citadas anteriormente, permite una identificación económica y sin mayores complicaciones, mientras que la inoculación en animales de laboratorio, requiere el montaje y mantenimiento de un Bioterio *ad hoc*.

Conclusiones

En el presente trabajo, la Ciudad de Santa Fe aparece colonizada por el *Cryptococcus neoformans*, especialmente en la zona céntrica y también en una zona costera, en lugares habitados por palomas cuyas deyecciones se encuentran corrientemente en techos, cornisas y veredas frecuentados por habitantes, trabajadores y transeúntes (4, 5, 6, 10, 12), lo que favorece la inhalación de sus unidades infectantes (5, 6). El amplio rango de temperatura en el que fue detectado oscila entre 6,4°C y 25°C lo que confirmaría su supervivencia en los nichos ecológicos representados por los palomares. La cercanía a cursos de agua que actuarían como bebederos para las aves y su papel regulador de la humedad ambiente, resultaría en un importante componente ecológico para la sobrevida del hongo.

La presencia habitual en ámbitos urbanos de este hongo de reconocido comportamiento como agente etiológico de micosis oportunistas (9) en individuos inmunocomprometidos (16, 17, 18, 19), entre los que se encuentran pacientes transplantados, otros con tratamientos prolongados con corticoides, antibióticos de amplio espectro, inmunosupresores, aquellos portadores de enfermedades metabólicas y actualmente, los pacientes HIV positivos, sin olvidar a los niños y ancianos, visitantes asiduos a plazas y paseos, hace resaltar la necesidad de implementar medidas comunitarias de profilaxis: como son la cuarentena de palomas en criaderos privados o públicos, la higiene de sus heces en los reservorios urbanos, y especialmente,

la educación sanitaria mediante una sistemática información pública.

Bibliografía

- 1- MANDELL G.L.; DOUGLAS R.G.Jr.; BENNETT J.E. 1991. "Enfermedades infecciosas. Principio y Práctica". Editorial Médica Panamericana. Tomo II 3ª ed. 2.096-2.104.
- 2- RIPPON, J.W. 1990. "Hongos y Actinomicetos Patógenos". Ed. Interamericana. 3ªed. 629-655.
- 3- BAVA, J.A. 1995. Estado Actual de la Criptococosis en la Argentina. Rev. Arg. de Micología III, 1.
- 4- BAVA, J.A. 1993. Criptococosis en la República Argentina. Re. Arg. de Micología XVI, 3.
- 5- KELLEY, W. 1991. "Medicina Interna". Ed. Médica Panamericana (Buenos Aires). 1.733,1.734 y 1.745.
- 6- STEIN, J.H. 1993. "Medicina Interna". Editorial Salvat. 1ªedición, II. 1.509-1.513.
- 7- NEGRONI, P. 1984. "Micosis Cutáneas y Viscerales" López Libreros 8ª edición (Buenos Aires). 148-151.
- 8- RUBINSTEIN, P; NEGRONI, R. 1981. "Micosis Broncopulmonares del Adulto y el Niño" Editorial Beta (Buenos Aires).325-329.
- 9- FERRARAS; ROZMAN. 1995. "Medicina Interna" 13ª Ed. Editorial Mosky-Doyma, II.2.425-2.426.
- 10- PUMAROLA, A.; RODRIGUEZ TORRES, A., GARCIA RODRIGUEZ, A., PIEDROLA ANGULO G. 1987. "Microbiología y Parasitología Médica" 2ªed. Editorial Salvat. 786-789.
- 11- ROBBINS S.L.; CONTRAN, R.S. 1988. "Patología Estructural y Funcional" 3ª de. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. 354-355.
- 12- HENRY, J.B. 1993. "Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio" 9ª ed. Masson. Salvat Medicina.
- 13- GARCIA DEL MORAL, R. 1993. "Laboratorio de Anatomía Patológica" 1ªed. Interamericana. Mac Graw-Hill.
- 14- BOYA BEGUE, J. 1996. "Atlas de Histología y Organografía microscópica" Ed. Médica Panamericana" S.A.
- 15- LOPEZ MARTINEZ; R.; MENDEZ TOVAR, L.J.; HERNANDEZ HERNANDEZ, F.; CASTAÑÓN OLIVARES, R. 1995. "Micología Médica: procedimiento para el diagnóstico de laboratorio". Ed. Trillas (México).
- 16- PARRAS VAZQUEZ, F., et al. 1987. Meningitis por *Cryptococcus neoformans*. Enf. Inf. y Microb. Clínica. V, 4: 209-213.
- 17- ZAMORA, I.; FERRER, Y.; BUTTI, M.; OLSINA, M. 1992. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en líquido pleural de un paciente cirrótico. Enf. Inf. y Microb. Clínica X, 6: 377-378.
- 18- CASTRO GUARDIOLA, A. Et al. 1991. Estudio de 16 casos de infección por *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA. Enf. Inf. y Microb. Clínica IX, 2: 91-94.
- 19- MARTOS, A; MASCARO, J.; SANTIN, M.; ARIZA, J.; CARRATALA, J.; PODZAMCZER, D. 1992. Criptococosis pulmonar en el SIDA. Enf. Inf. y Microb. Clínica X, 10: 607-609.

- 20-** KONEMAN, E.; ROBERTS, G. 1987. "Micología. Práctica de Laboratorio". 3ª Editorial Médica Panamericana (Buenos Aires). 175-1990.
- 21-** DENNING, D.; STEVENS, D.; HAMILTON, J. 1990. Comparison of Guizotia abyssinica Seed Extract (Birdseed) Agar with Conventional Media Selective Identification of *Cryptococcus neoformans* in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 11: 2.565-2.567.
- 22-** ROBLES, A.M.; ARECHAVALA, A.; BIANCHI, M. 1995. Seminario: Diagnóstico de Criptococosis. Unidad de Micología. Hospital de Infecciosas F.J. MUÑIZ.
- 23-** VANNI, C.; SARSOTTI, P. 1996. Aislamiento de cepas de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas. IV Jornadas de Comunicaciones Técnico Científicas. Facultad de Bioquímica y Cs.Bs. U.N.L. (Santa Fe). Argentina.
- 24-** TALEB, M.S.; SARSOTTI, P.V.; BROSUTTI, S.; PERALTA, V.; GOMEZ, R.G. 1996. Flora fúngica intestinal en pacientes inmunocomprometidos. IV Jornadas Técnico Científicas. Facultad de Bioquímica y Cs.Bs. U.N.L. (Santa Fe) - Argentina.
- 25-** SARSOTTI, P.; GOMEZ, R.G. 1996. La Flora fúngica y las alteraciones Ecológicas. IV Jornadas Técnico Científicas. Facultad de Bioquímica y Cs.Bs. U.N.L. (Santa Fe). Argentina.
- 26-** RUATTA, J.; SARSOTTI, P.V.; GUTIERREZ, C.; VANNI, C.; GARCIA, C. 1997. Tercer Encuentro Bioquímico. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R (Rosario). Argentina.
- 27-** GUTIERREZ, C.; VANNI, C.; SARSOTTI, P.V.; RUATTA, J.; GARCIA, G.; GOMEZ, R.G.; BROSUTTI, S.; PERALTA, V. 1997. Estudio comparativo de la Actividad Ureásica del *Cryptococcus neoformans*. Tercer Encuentro Bioquímico. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. (Rosario). Argentina.
- 28-** VANNI, C.; SARSOTTI, P.V.; GOMEZ, R.; GUTIERREZ, C.; RUATTA, J.; GARCIA, G.; BROSUTTI, S.; PERALTA, V. 1997. Influencia de la Variación de Componentes Culturales en el aislamiento del *Cryptococcus neoformans*. Tercer Encuentro Bioquímico. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. (Rosario). Argentina.
- 29-** CABAGNA, M.; VANNI, C.; SARSOTTI, P.; GOMEZ, R.; GUTIERREZ, C. 1997. Tinciones Histológicas en Micosis Experimentales del Ratón. Tercer Encuentro Bioquímico. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. (Rosario). Argentina.
- 30-** SARSOTTI, P.; VANNI, C.; GUTIERREZ, C.; CABAGNA, M.; GARCIA, G.; RUATTA, J.; BROSUTTI, S. 1997. La Paloma: Reservorio del *Cryptococcus neoformans*. III Jornadas Científicas sobre Medio Ambiente. U.N.L.P. (La Plata). Argentina.
- 31-** CABAGNA, M.; COSTAMAGNA, A.; FUENTES, M.; GRACIANI, G.; SARSOTTI, P.V.; VANNI, C.; RUATTA, J. 1998. Infección Experimental por *Cryptococcus neoformans*. VIII Congreso de Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.D.C. (Tandil). Argentina.