

Determinación de la variedad de cepas de *Cryptococcus neoformans* del cepario de la Cátedra de Micología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral

García, Guillermo; Gutierrez, César; Sarsotti Pedro; Vanni, Carlos.

Cátedra de Micología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Paraje el Pozo. Santa Fe. Argentina. C.P.3000. E-mail: paramico@lbcn.unl.edu.ar

RESUMEN: Para determinar la prevalencia en nuestro medio del *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, fueron estudiadas 38 cepas, 32 de las cuales correspondían a aislamientos del medio ambiente (14) y las 6 cepas restantes pertenecían a aislamientos clínicos. Se utilizaron los medios de diferenciación de variedades propuestos por Kwon-Chung y col. (glicina - l-canavanina - azul de bromotimol) y el propuesto por Dufait y col (asimilación de D-prolina).

Todas las cepas de *Cryptococcus neoformans* fueron identificadas como no pertenecientes a la var. *gattii*.

Palabras claves: *Cryptococcus neoformans*, variedades.

SUMMARY: Study of the varieties of *Cryptococcus neoformans* isolates in the yeast collection of the Department of Mycology of the School of Biochemistry and Biological Sciences of the Litoral National University. García, Guillermo; Gutierrez, César; Sarsotti Pedro; Vanni, Carlos. 38 strains of *Cryptococcus neoformans* were studied to determinate the prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, 32 were recovered from ambiental sources (16) and the other 6 belong to clinic strains. We used the varieties differentiation media proposed by Kwon-Chung et al. (glycine - l-canavanine - bromothimol blue) and by Dufait et al. (D-proline asimilation).

All the *Cryptococcus neoformans* strains were identified as no belonging to the var. *gattii*.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, varieties.

Introducción

El término **Criptococosis** es empleado para definir a la infección causada por la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*. Este microorganismo es capaz de causar enfermedad especialmente en individuos inmunocomprometidos.

Sobre la base de la heterogeneidad antigénica a nivel de polisacáridos capsulares, se reconoce la existencia de cinco serotipos (A, B, C, D y AD) (1). Por otro lado, basándose en características bioquímicas y morfológicas se dividía a esta especie en dos variedades, *Cryptococcus neoformans* var.

gattii (serotipos B y C) y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D). (2)(3). Recientemente, se ha propuesto la división de la var. *neoformans* en *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) *C. neoformans* var. *neoformans* (Serotipo D) (4).

Las var. *neoformans* y *grubii* tienen una distribución cosmopolita. Han sido aisladas de diversas fuentes naturales, pero las heces de palomas (*Columba livia*), tendrían un rol importante en su distribución y conservación en el medio ambiente (5) (6). Estas variedades son las responsables de la mayoría de los casos clínicos de criptococosis.

Luego que Ellis y Pfeiffer describieran el hábitat natural de la variedad *gattii*, relacionándolo con el *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis* (árboles autóctonos de Australia), la distribución geográfica de esta levadura, se ha considerado restringida (7). Los aislamientos clínicos de esta variedad son menores que los de las variedades *neoformans* y *grubii* y se han reportado en diversas partes del mundo, área tropicales y subtropicales de Australia (8), Brasil (9), sudeste de Asia y África, Sur de California (10), España (11). En nuestro país son pocos los reportes documentados (12).

Un aspecto de gran importancia del *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, es su capacidad para producir infección mayoritariamente en individuos sin alteración de su estado inmunológico (13). Esto constituye un fundamento de importancia en la separación de variedades, sobre todo en aislamientos ambientales.

El propósito de este trabajo es conocer la variedad predominante, tanto en aislamientos ambientales (14) como clínicos, en cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas en la ciudad de Santa Fe.

Materiales y métodos

Cepas control: Fueron utilizadas cepas tipificadas con antiseros específicos contra cada uno de los serotipos de *Cryptococcus neoformans* serotipo "A" "B" "C" y "D" como controles de las var. *grubii*, *gattii* y *neoformans*, respectivamente, tipificadas con antiseros específicos contra cada uno de los serotipos.

Cepas estudiadas: Se estudiaron 38 cepas de *Cryptococcus neoformans*, 32 de las cuales, correspondían a aislamientos del medio ambiente realizados en un trabajo anterior (14) y las 6 cepas restantes pertenecían a aislamientos clínicos.

Todas las cepas fueron repicadas en agar Sabouraud Glucosado (Britania) e incubadas a 28 °C para su posterior identificación.

Pruebas morfológicas: Se realizó observación de cápsula con tinta china, micromorfología en Extracto de malta al 3%, características macroscópicas de la colonia y consistencia mucosa del cultivo.

Pruebas bioquímicas y fisiológicas para identificación de género y especie: Se confirmó género y especie de las cepas en estudio mediante pruebas bioquímicas siguiendo las técnicas propuestas por

Kreger van Rij y Barnett (15)(18): fermentación y asimilación de hidratos de carbono, asimilación de fuentes de nitrógeno, actividad ureásica y de fenoloxidasa y termotolerancia a 37 °C.

Pruebas bioquímicas para la clasificación en variedades *gattii* y *no gattii*: se utilizaron el método de glicina - l-canavanina - azul de bromotimol (CGB) propuesto por Kwon-Chung y cols (16) y la asimilación de D-prolina utilizado por Dufait y cols (17) en el medio base de carbono descrito por Kreger van Rij y Barnett (15) (18).

CGB: Se considera reacción positiva en este medio de cultivo cuando la cepa inoculada es capaz de virar el color del medio de amarillo a azul verdoso en 2 a 5 días. Las cepas con esta capacidad son consideradas pertenecientes a la var. *gattii*. En cambio las otras variedades no crecen en este medio de cultivo o no viran el color (15).

Asimilación de D-prolina: La variedad *gattii* es capaz de utilizar la D-prolina como única fuente de Nitrógeno, en contraste las otras variedades son incapaces de esto. (17)

Resultados

Las 38 cepas fueron identificadas como *Cryptococcus neoformans* var. *no gattii* tanto por el método propuesto por Kwon Chung y cols como por el de Dufait y cols. Ambos métodos presentaron igual sensibilidad y especificidad para diferenciar las variedades de *C. neoformans*. El método de Kwon-Chung y cols presentó el problema del establecimiento del pH adecuado para la realización de la prueba pero cuando esto fue resuelto no presentó ningún problema en su realización, en cambio el método de Dufait y cols. no presentó ningún tipo de inconvenientes en su puesta a punto y realización.

Comentarios y Conclusiones

Se concluye que las variedades de *Cryptococcus neoformans* predominantes en nuestros aislamientos clínicos y de medio ambiente son var. *neoformans* y var. *grubii*.

Si bien el territorio argentino no es reconocido como endémico de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, los reportes de Drohuet, sobre seis aislamientos realizados en Brasil (9), los 4 aislamientos repor-

tados por Bava, J. A., en Argentina (12), los de Chile y Colombia (19), podrían ser indicio de una muy baja endemicidad de esta variedad en el territorio Sudamericano.

Ambos métodos empleados para la identificación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*, presentaron igual sensibilidad y especificidad.

El método de glicina -l-canavanina - azul de bromotimol (CGB) propuesto por Kwon-Chung y col (16) resultó de más difícil preparación ya que tiene el inconveniente del establecimiento del pH ideal (6,9 a 7,1) para que el medio de cultivo sea útil para diferenciar las variedades, esto se debe, a nuestro criterio, a la falta de un sistema buffer en su formulación. Sin embargo, una vez establecido dicho pH, el medio resultó ser muy útil y de fácil utilización ya que solamente se debe inocular la cepa en estudio en su superficie e incubar a 28°C esperando el viraje de color.

Por otro lado el método propuesto por Dufait y cols presenta tanto en su preparación, procedimiento operatorio y lectura una simplicidad importante, por esta razón, a nuestro entender resulta el más útil para emplear en este tipo de estudio epidemiológico.

Bibliografía

- 1- Evans, E. E. 1950. «The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*». J. Immunol. **64**:423-430.
- 2- Bennet, J.; Kwon Chung, K.; Theodore, T. 1978. "Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*". Sabouraudia, **16**: 167-174.
- 3- Swinow, D. 1984. "Study of *Cryptococcus neoformans* varieties". Mykosen, **27** (3), 137-141.
- 4- Franzot, S. P., I. F. Salkin, AND A. Casadevall. 1999. "*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* sero-type A isolates" J. Clin. Microbiol. **37**:838-840.
- 5- Emmons, CH. 1955. "Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (Columbia livia)". Am. Jour. Hyg. **62** : 227-232.
- 6- Littman, M.; Schneierson, S. 1959. "*Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City". Am. Jour. Hyg. **69**: 49-59.
- 7- Sorrell, T.C.; Brownlee, A.G.; Ruma, P.; Malik, R.; Pfeiffer, T.J.; Ellis, D.H. 1996. "Natural Environmental Sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*" J. Clin. Microb., **34** (5): 1261-1263.
- 8- Sorrell, T.C.; Brownlee, A.G.; Ruma, P.; Malik, R.; Pfeiffer, T.J.; Ellis, D.H. 1996. "Natural Environmental Sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*" J. Clin. Microbiol. **34** (5): 1261-1263.
- 9- Drouhet, E.; Dupont, B.; Reyes, G. 1986. "Antigenes de *Cryptococcus neoformans* et response immunologique dans la cryptococcose, mycose d'actualité et mycose de l'avenir". Bull. Soc. Fra. Mycol. Med. **15** (1): 21-30.
- 10- Fromtling, R.; Shadomy, S.; Shadomy, J.; Dismukes, W. 1982. "Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in nonendemic areas". J. Clin Microbiol. **16** (2): 408-410.
- 11- Baro, T.; Torres-Rodríguez, J.M.; Morera, Y.; Alía, V.; López, O.; Mendez, R.. 1999. "Serotyping of *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Spain" J. Clin. Microbiol. **37**(4): 1170-1172
- 12- Bava, A. J. 1993. "Criptococosis en la Argentina". Revista Argentina de Micología. **15** (3): 03-41.
- 13- Van Dam, M.; Saeton, R.; Hamilton, A. 1998. "Analysis of HLA association in susceptibility to infection with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Papua New Guinean population". Med. Mycol. **36** : 185-188.
- 14- Vanni, C.; Sarsotti, P.; Ruatta, J.; Garcia, G.; Gutierrez, C.; Cabagna, M. 1998. "Ecología de *Cryptococcus neoformans* en Santa Fe". Rev. Fac. Bioq. y Cs. Bs. **2** : 25-30.
- 15- Kreger-Van-Rij. 1984. "The yeast a taxonomic study". Elsevier Science Publishers B. V. (Amsterdam. Holanda).
- 16- Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck, And J. E. Bennett. 1982. "Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C)". J. Clin. Microbiol. **15** :535-537.
- 17- Dufait, R., R. Velhol, De Vroey, C - 1987. "Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation". Mykosen **30** :483.
- 18- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. 1990. "Yeast: Characteristic and identification". 2ª Ed. Cambridge University Press, (Cambridge. U. K.)
- 19- Callejas, A.; Ordoñez, N.; Rodríguez, M.; Castañeda, E. 1998 "First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C, from environment in Colombia". Medical Mycology. **36**: 341-344.