

DETERMINACIÓN DE LA VARIEDAD DE CEPAS DE *Cryptococcus neoformans* AISLADAS DE PACIENTES CON SIDA

Canelo C¹, Navarro A², Guevara M², Urcia F², Zurita S², Casquero J².

¹ Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

² División de Micología, Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

RESUMEN

Cryptococcus neoformans tiene 2 variedades: *neoformans* y *gattii*. El primero afecta a pacientes inmunosuprimidos y la variedad *gattii* produce enfermedad en individuos aparentemente sanos originando compromiso neurológico. En nuestro país no se realizan pruebas bioquímicas diferenciales, por lo que este estudio permitió estandarizar un método de tipificación de las variedades en cepas de *C. neoformans* de origen clínico mantenidas en el Instituto Nacional de Salud del Perú (INS). Entre abril de 1997 y diciembre de 1998, el INS recibió 18 cepas de *C. neoformans* aisladas de pacientes con SIDA. La confirmación de las especies fue realizada según métodos convencionales: observación de levaduras encapsuladas, prueba de la urea, asimilación de carbohidratos y tolerancia a la temperatura. Adicionalmente se verificó la ausencia de la enzima nitrato reductasa y se realizó la prueba de la fenoloxidasa modificada. Las 18 cepas fueron tipificadas como variedad *neoformans* usando el agar CGB. No se encontró ninguna cepa de variedad *gattii*.

Palabras clave: Serotipificación, *Cryptococcus neoformans*, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans has two varieties: *neoformans* and *gattii*. The first one affects mainly immunosuppressed patients and the latter causes neurological lesions. Differential biochemical tests are not performed in Peru, so this study was able to standardize a typification method among *C. neoformans* strain varieties from clinical origin that were maintained at the National Institute of Health (INS) of Peru. Between April 1997 and December 1998, INS received 18 *C. neoformans* strains isolated from AIDS patients. Confirmation of the species was performed according to conventional methods: encapsulated yeast observation, urease test, carbohydrate assimilation and temperature toleration. Additionally, the absence of the nitrate reductase enzyme was verified and the modified phenoloxidase test was performed, too. All 18 strains were typified as *neoformans* by means of CGB. No *gattii* strains were found.

Key words: Serotyping, *Cryptococcus neoformans*, Acquired immunodeficiency syndrome.

INTRODUCCION

La criptococosis es la infección oportunista más común del SNC en pacientes con SIDA en los Estados Unidos^{1,2}. El agente etiológico, *Cryptococcus neoformans*, presenta dos variedades *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D), aislada principalmente de excretas de palomas, y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C) a partir de diferentes especies de *Eucalyptus*³⁻⁹.

Salkin y Hurd¹⁰ reportaron el uso del agar glicina cicloheximida rojo de fenol (GCP) para la diferenciación de los cultivos de cepas de *C. neoformans* en sus dos variedades. Kwon-Chung y col.¹¹ desarrollaron el medio canavanina glicina azul de bromotimol sódico (CGB) y un total de 213 cepas de *C. neoformans* fueron probadas en los agares CGB, GCP y CDB (creatinina dextrosa azul de bromotimol). Ellos concluyeron que el medio CGB fue superior al GCP y CDB en el quinto día de incubación y el

100,0% de *C. neoformans* var. *neoformans* pudo diferenciarse de la variedad *gattii*.

El medio CGB emplea Glicina como única fuente de carbono y nitrógeno; la droga que ayuda a la tipificación de ambas variedades es el Sulfato de L-Canavanina y el indicador es el Azul de Bromotimol Sódico.

La diferenciación bioquímica de *C. neoformans* por variedades mediante el uso del medio CGB se debe a que 28,0 a 33,0% del serotipo A es sensible a ≤ 5 mg/L de canavanina y 100,0% del serotipo D es sensible a esta concentración de la droga. De los aislamientos del serotipo A resistentes a canavanina, 10,0 a 20,0% son capaces de asimilar la glicina; sin embargo, éstos no crecen cuando son cultivados sobre el medio que contiene ambos compuestos. Solamente 11,0% de los aislamientos serotipo D utilizan la glicina, pero todos son sensibles a la canavanina; en cambio, 100,0% de las cepas de *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C) resisten la canavanina hasta o excediendo los 960 mg/L y asi-

Correspondencia: Carlos Canelo. Instituto Nacional de Salud. Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Apartado Postal 471.

Tel.: (0511) 4719920 - Fax: (0511) 4710179.

Email: micolog@ins.sld.pe

milan la glicina (Concentración de canavanina en el medio CGB: 30mg/L). Luego del metabolismo de este componente se forma amonio, el cual alcaliniza el medio haciendo virar el indicador hacia un color azul cobalto¹¹⁻¹⁴.

El estudio de las diferencias epidemiológicas de ambas variedades en 725 cepas de origen clínico obtenidas de diferentes partes del mundo antes de la epidemia del SIDA, confirman la superioridad del medio CGB sobre otros medios para la diferenciación de las dos variedades¹⁵. La variedad *neoformans* fue encontrada en todos los años (entre 1972 y 1992) que se hicieron aislamientos, mientras que la variedad *gattii* fue observada solamente a partir de 1986¹⁶. En un estudio de 68 cepas aisladas de pacientes peruanos inmunocompetentes, la determinación de la variedad fue realizada en el Instituto de Medicina Tropical "Prince Leopold" (Bélgica) identificándose en 66/68 la var. *neoformans* y en 2/68 la var. *gattii* fue identificada mediante su habilidad de asimilar la D-Prolina¹⁷.

La determinación de las variedades de *Cryptococcus neoformans* usando el agar CGB no ha sido realizada ni estandarizada en nuestro país. Por lo tanto, este estudio permitirá utilizar una metodología sencilla para la tipificación de las cepas de *C. neoformans* en sus dos variedades, siendo los objetivos del trabajo:

- Determinar la variedad en cepas de *C. neoformans* provenientes de pacientes inmunosuprimidos que se encuentran conservadas en la micoteca del INS.
- Estandarizar las técnicas para determinar las actividades de las enzimas nitrato reductasa y fenoloxidasa en cepas de *C. neoformans*.
- Evaluar el comportamiento cultural de las cepas de *Cryptococcus* sobre el agar CGB para establecer la diferenciación entre la var. *neoformans* y *gattii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se evaluaron 18 cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de muestras de LCR que fueron remitidas al Laboratorio de Micosis Oportunista del INS desde abril de 1997 hasta diciembre de 1998. Todas las cepas procedían de pacientes con SIDA. Sólo se señala la edad en 12 pacientes cuyo promedio fue de 35,4 años (18-72-72 años). En 16 pacientes se registró el sexo, hallándose 12 varones y 4 mujeres. Como controles se emplearon las cepas H-0058-620 de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotipo A y la H-0058-628 de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo B, procedentes del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Además, se utilizó un aislamiento autóctono de *Candida albicans*, identificado en el Instituto Nacional de Salud.

IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE *C. NEOFORMANS*

Se realizaron las siguientes pruebas recomendadas: Tinción negativa con Tinta China, prueba del tubo germinal¹⁸, formación de hifas, pseudohifas, clamidosporas y blastoconidias¹⁹, formación de peli-

cula en caldo sabouraud dextrosa²⁰, tolerancia a la temperatura de 37°C²¹, prueba de la ureasa, asimilación de carbohidratos: glucosa, lactosa, sacarosa, galactosa, maltosa y rafinosa¹⁸, reducción rápida del nitrato²² y presencia de la enzima fenoloxidasa (Canelo C, Casquero J. Comunicación personal).

DETERMINACIÓN DE LA VARIEDAD DE *Cryptococcus neoformans*

Se tomó una asada de cada cepa y se inoculó en tubos que contenían el agar CGB, se incubaron a 28°C por cinco días, realizando lecturas diarias. Una prueba positiva fue indicada por un cambio del color inicial amarillo oro (pH = 5,8 ± 0,1) hacia un color azul cobalto (pH ≥ 7,0) del medio. Si éste permaneció con su color inicial, se trató de una prueba negativa¹¹.

RESULTADOS

En 100,0% de las cepas se observó levaduras redondas poco encapsuladas mediante la tinción negativa con tinta china; desarrollo a 37°C, incapacidad para formar tubo germinativo en suero humano, no formaron hifas o pseudohifas ni clamidosporas en agar Corn Meal- Tween 80 y tampoco formaron película en caldo sabouraud dextrosa. Todas las cepas fueron ureasa positivas y carecieron de la enzima nitrato reductasa. El 100% de los aislamientos asimiló la glucosa, galactosa, maltosa y sacarosa, pero no asimilaron la lactosa y sólo 38,8% (7/18) de los aislamientos asimiló la rafinosa.

Las 18 cepas de *C. neoformans* fueron tipificadas como var. *neoformans* sobre el medio CGB, después de 5 días de incubación a 28°C. La tipificación de la



Figura 1. Diferenciación bioquímica de *C. neoformans* var. *gattii* (izquierda), *C. neoformans* var. *neoformans* (derecha), mediante el uso de agar canavanina glicina azul de bromotimol (CGB).

variedad de las cepas control de *C. neoformans* se realizó satisfactoriamente y se comprobó que la cepa control serotipo A y todas las cepas de origen clínico de *C. neoformans* fueron incapaces de crecer y modificar el color inicial (amarillo oro) del agar CGB clasificándolas como var. *neoformans*; en cambio, la cepa control serotipo B creció e hizo virar levemente el color (1+) del medio en el segundo día de incubación, en el tercer día cambió el medio hacia un color azul verdoso (2+), y en el cuarto día el agar se tornó azul cobalto con un fondo azul verdoso (3+), y que se mantuvo sin ninguna variación hasta por lo menos 2 semanas de incubación a 28°C comprobándose que esta cepa fue var. *gattii* (Figura 1).

El valor del pH = $5,8 \pm 0,1$ del medio es crítico, por lo que se debe ser preciso en su determinación. Un pH menor que lo indicado puede darnos resultados indeterminados (2+) para la variedad *gattii*.

El tamaño del inóculo y la edad del cultivo no fueron factores críticos en la determinación de la variedad. No se halló ningún resultado indeterminado (2+) en los 18 aislamientos de *C. neoformans* var. *neoformans*.

DISCUSIÓN

El 100,0% de las cepas de origen clínico provino de pacientes con SIDA, ya que este síndrome ha llegado a ser el principal factor predisponente para la criptococosis. Esta última, es la cuarta causa de infección en pacientes con SIDA y se manifiesta en cerca de un tercio de estos pacientes^{1,23}. La incidencia de infección criptocócica en ellos ha sido estimada en 6,0 a 15,0% en los Estados Unidos, Europa Occidental y Australia; sin embargo en África meridional el cuadro meníngeo ocurre en 15,0 a 30,0%¹².

Las edades de los pacientes de los cuales se aisló *C. neoformans*, refleja que la mayoría de los casos ocurren entre los 20 a 39 años tal como lo observado en estudios realizados en Colombia y Argentina^{16,24}. El predominio masculino sobre el femenino encontrado en 16 pacientes, estuvo en una proporción de 3:1, coincidiendo con lo observado en los Estados Unidos de América antes de la era del SIDA. En aquella década la criptococosis ocurrió 2 o 3 veces más en varones que en mujeres. Actualmente en los Estados Unidos aproximadamente igual porcentaje de cada sexo es infectado con *C. neoformans*⁶.

El tamaño de la cápsula está determinada por características genotípicas de cada cepa y por las condiciones de crecimiento. Las células encapsuladas de *C. neoformans* no son fagocitadas¹². Los estudios sobre el rol de la cápsula en la virulencia de este hongo no han explicado aún porque *C. neoformans* es el único patógeno verdadero en el género *Cryptococcus* en el cual todos los miembros de su especie son normalmente encapsulados²⁵.

El 38,8% de las cepas asimiló la rafinosa. Esto verificó que la asimilación de este azúcar es variable en cada cepa.

La ausencia de la enzima nitrato reductasa fue verificada mediante una prueba rápida de reducción

del nitrato, en la que se optimiza el pH entre 5,8 a 6,5; se usa una mayor concentración del sustrato (nitrato de potasio) para evitar resultados falsos negativos; una temperatura de 45°C y aumento de la permeabilidad celular producido por el cloruro de benzalkonio (22).

En América del Sur, se ha informado el aislamiento de la variedad *gattii* en pacientes no-SIDA^{16,17,23,24}. En el mundo sólo se ha informado de cuatro casos de SIDA asociados a criptococosis causada por la var. *gattii*: en Zaire²⁷, Canadá²⁸, Estados Unidos de América²⁹ y Brasil³⁰. Por lo que se plantea la posibilidad que los pacientes con SIDA no están expuestos a esta variedad porque no están en contacto con árboles del género *Eucalyptus*⁵.

Estos antecedentes plantean la búsqueda de reservorios para la var. *gattii* en nuestro país, así como también estudios de tipo epidemiológico para conocer la distribución de ambas variedades.

No obstante que los casos de criptococosis causados por la var. *gattii* son infrecuentes, debemos estar en capacidad para su correcta identificación, logrando aprovechar los datos clínico-epidemiológicos de cada caso esporádico. La tipificación inmediata de algún aislamiento de esta variedad, permitirá un cuidadoso seguimiento de la enfermedad producida por este hongo, ayudando a conocer más las diferencias de la expresión clínica entre ambas variedades. Se ha establecido que la var. *gattii* se encuentra en huéspedes aparentemente sanos y que 90,0% de las infecciones por *C. neoformans* var. *neoformans* ocurren en huéspedes inmunosuprimidos; además, la mortalidad entre los pacientes con la variedad *neoformans* fue alta, mientras ninguno con la variedad *gattii* falleció, pero frecuentemente tuvieron secuelas neurológicas que requirieron cirugía y terapia prolongada³¹.

Las diferencias en la incidencia y expresión de la enfermedad clínica sugiere potenciales diferencias importantes en la patogénesis y en las interacciones huésped-hongo causadas por ambas variedades de *C. neoformans*²⁶.

La incidencia de criptococosis en las Américas no es conocida, pero si tenemos en cuenta que en los Estados Unidos este valor fluctúa entre 5,0-10,0%, y en Argentina sería 4,6%²⁴, el número de casos acumulados de criptococosis en nuestro país debe ser considerable y debe empezar a conocerse.

CONCLUSIONES

- * El 100,0% de las cepas conservadas (18) en la micoteca del INS fueron *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.
- * La prueba de la reducción rápida del nitrato, en 10 minutos y a 45°C, demostró la ausencia de la enzima nitrato reductasa en todas las cepas de *C. neoformans*, siendo recomendable su empleo.
- * Se comprobó la especificidad del agar CGB para la diferenciación bioquímica de las variedades de *C. neoformans*.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Salud de Colombia por habernos proporcionado las cepas controles de *C. neoformans* var. *neoformans* y var. *gattii*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Dal Pan GJ, Mc Arthur JC.** Neuroepidemiology of HIV Infection. *Neurol Clin* 1996; 14: 359-82.
2. **Powderly WG.** Cryptococcal Meningitis and AIDS. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 837-42.
3. **Arguero B, Garza D, Torres M.** Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus treticornis*. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13: 27-8.
4. **Chakabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye AA.** Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3340-2.
5. **Ellis DH, Pfeiffer TJ.** Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1642-4.
6. **Levitz SM.** The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of criptococcosis. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 1163-9.
7. **Pfeiffer T, Ellis D.** Enviromental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. *J Infect Dis* 1991; 163: 929-30.
8. **Pfeiffer T, Ellis D.** Additional *Eucalyptus* hosts for *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii*. Abstracts of the 13th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). Australia, 1997.
9. **Sorell TC, Ellis DM.** Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 42-3.
10. **Salkin IF, Hurd NJ.** New Medium for Differentiation of *Cryptococcus neoformans* Serotype Pairs. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 169-71.
11. **Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennet JE.** 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* 1982; 15: 535-7.
12. **Mitchell TG, Perfect JR.** Cryptococcosis in the era of AIDS 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 515-48.
13. **Min KH, Kwon-Chung KJ.** The biochemical bases for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. *Zbl Bakt Hyg A* 1986; 261: 471-6.
14. **Polacheck I, Kwon-Chung KJ.** Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29: 468-73.
15. **Kwon-Chung KJ, Bennet JE.** Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 123-30.
16. **Ordóñez N, Castañeda E.** Serotificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. *Biomed* 1994; 14: 131-9.
17. **Bustamante B, Swinne D.** Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Dos Pacientes Peruanos. Datos no publicados.
18. **Casquero C, Zurita S.** Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Micosis Oportunistas y Profundas. Serie de normas técnicas N° 23. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud. Perú, 1997.
19. **Koneman EW, Roberts ED.** En: *Micología. Práctica de Laboratorio*. Editorial Médica Panamericana, Bs As. 3ª. Ed, 1992: 176-95. Buenos Aires-Argentina, 1992.
20. **Hunter MS, Cooper BH.** Yeast of medical importance. In: E. H. Lenette, A. Balows, W. J. Hausler, and J. P. Truant (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 3th ed. American Society for Microbiology, Washington, 1980: 562-76.
21. **Rippon JW, Micología Médica.** Hongos y actinomicetos patógenos. Nueva Editorial Interamericana, México, 3ª ed, 1990: 629-59. México, 1990.
22. **Hopkins, J. M and G. A. Land.** Rapid method for determining nitrate utilization by yeasts. *J Clin Microbiol* 1997; 5: 497 - 500.
23. **Kwon-Chung KJ, Bennet JE.** *Medical Mycology*. Ed. Lea and Lebiger. 1st. Ed, Philadelphia, 1977: 497-500.
24. **Bava AJ y col.** Estudio de algunos aspectos epidemiológicos de 253 casos de criptococcosis. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 111-4.
25. **Kwon-Chung KJ, Rhodes JC.** Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1986; 51: 218-23.
26. **Saag MS.** Editorial response: clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 35-6.
27. **Kapenda K.** Meningitis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Zairean AIDS Patient. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6: 320-1.
28. **St Germain G, Noel G, Kwon-Chung KJ.** Disseminated Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Canadian patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 587-8.
29. **Clancy MN, Fleishmann J, Howard DH, Kwon-Chung KJ, Shimiku RY.** Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient with AIDS in southern California. *J Infect Dis* 1990; 161: 809.
30. **Rozenbaum R.** *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Brazilian AIDS Patient. *Mycopathol* 1990; 112: 33-4.
31. **Speed B, Dunt D.** Clinical and hosts differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 28-34.