

COMUNICACION BREVE

## Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendros

Alexandra Castañeda <sup>1</sup>, Sandra Huérfano <sup>1</sup>, María Claudia Rodríguez <sup>2</sup>, Elizabeth Castañeda <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup>Hospital Erasmo Meoz, Cúcuta, Colombia.

Durante 1996-1997, se llevó a cabo en Cúcuta un estudio para determinar el hábitat de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* debido a que los casos clínicos ocasionados por esa variedad se presentan con alta frecuencia en dicha ciudad. A partir de 2 de 68 almendros (*Terminalia catappa*) localizados y estudiados en la ciudad, se logró aislar *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C. El objetivo del presente trabajo fue realizar un seguimiento de los dos almendros positivos, con el fin de evaluar el tiempo de permanencia del hongo en asocio con los detritos en diferentes épocas del año. Se tomaron muestras de los dos árboles durante 26 meses y de 9 almendros adicionales; las muestras se extrajeron con una solución tampón fosfato suplementada con antibióticos; el extracto se sembró en medios selectivos y se identificó la especie con base en la morfología macro y microscópica y en pruebas bioquímicas. La determinación de la variedad y el serotipo se realizó con el empleo de técnicas estandarizadas. Del total de 160 muestras de los dos almendros, 31 (19,3%) fueron positivas para *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C así como una muestra de 1 de los 9 almendros adicionales. Estos hallazgos confirman que el almendro (*Terminalia catappa*) puede tener algún papel como planta intermediaria para la var. *gattii* y, además, que la variedad está presente en el área durante todo el año, ya que se logró recuperar en diferentes meses a lo largo de todo el estudio.

**Palabras clave:** *Cryptococcus neoformans*, ecología, hábitat, almendros.

### Recovery of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C from almond trees detritus

During 1996 to 1997 a study conducted to search for the habitat of *C. neoformans* var. *gattii* was carried out in Cúcuta, due to the high frequency of clinical cases caused by this variety. From a total of 68 almond trees (*Terminalia catappa*), two were positive for *C. neoformans* var. *gattii* serotype C. The aim of the present study was to follow-up the 2 positive trees in order to evaluate the permanence of the yeast in different months of the year. Samples were extracted with PBS supplemented with antibiotics and were plated in selective media. Species were assigned based on macro and microscopic morphology and biochemical tests. Variety and serotype was also determined with standardized techniques. From the two positive almond trees, samples were taken during 26 months and additionally 9 new almond trees were screened. From 160 samples, 31 (19,3%) were positive for *C. neoformans* var. *gattii* serotype C as well as 1 of the 9 extra trees. These findings confirmed that almond trees (*Terminalia catappa*) could be a intermediate habitat for the var. *gattii*. In addition, that *C. neoformans* var. *gattii* serotype C could be present during the whole year in the area.

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*, ecology, habitat, almond trees.

La criptococosis es una micosis oportunista causada por la levadura encapsulada *Cryptococcus neoformans* (1,2). El hombre adquiere la infección

por la inhalación de partículas infectantes que se encuentran en el medio ambiente. Estas partículas pueden ser las blastoconidias poco encapsuladas las cuales tienen un tamaño de 4-5  $\mu\text{m}$  o las basidiosporas que miden menos de 3  $\mu\text{m}$  (1). El hongo ha sido clasificado en dos variedades y

Correspondencia:

ecastaneda@hemagogus.ins.gov.co

Recibido: 23/11/00; aceptado: 21/12/00

cinco serotipos: var. *neoformans*, serotipos A, D, AD y var. *gattii*, serotipos B y C (3). Las variedades difieren en sus características fenotípicas y genotípicas y en su hábitat (2-11); la var. *neoformans* es cosmopolita (1,9), en tanto que la var. *gattii* está restringida a regiones tropicales y subtropicales (1,2,5).

El primer informe de un aislamiento ambiental de *C. neoformans* var. *neoformans* fue realizado por Sanfelice en 1894 a partir de jugo de duraznos (1) y el siguiente hallazgo fue informado por Emmons en 1951, cuando logró recuperar la levadura de suelos contaminados con excrementos de aves (6); estos resultados han sido obtenidos en varias oportunidades por diferentes autores (7-11). También se ha aislado de los detritos de algunos árboles como ficus y mango, así como de vegetales y frutas (12-14).

Con relación a la var. *gattii*, sólo en 1990 se logró recuperarla en Australia del medio ambiente, a partir de detritos de *Eucalyptus camaldulensis* (5). Este hallazgo se ha reproducido en Estados Unidos (California), Italia, México e India (15-17); también se ha recuperado la variedad a partir de otras especies de *Eucalyptus* como *E. tereticornis*, *E. gomphocephala*, *E. rudis* y *E. blakely* (18-20), así como de otros árboles como oitíes y acacias en Brasil (21,22). Adicionalmente, se han reportado aislamientos a partir de excrementos de murciélagos y de un avispero (23,24). Es importante mencionar que todos los aislamientos de la var. *gattii* recuperados de una fuente ambiental han sido serotipo B.

En Colombia, se han caracterizado las dos variedades de *C. neoformans* en los aislamientos clínicos; la var. *neoformans* constituye el 92,6% y la var. *gattii*, el 7,4%; sin embargo, es importante señalar que el 64% de los casos de criptococosis diagnosticados en Cúcuta son causados por la var. *gattii* (25-27). Basados en esta observación, se diseñó un estudio para determinar el hábitat de *C. neoformans* var. *gattii* en esa ciudad. Ese trabajo se llevó a cabo durante 11 meses durante los cuales se recolectaron y procesaron muestras de *Eucalyptus*, *Moquilea* (oití), *Delonix* (acacia) y *Terminalia* (almendros) y fue posible recuperar *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C, en detritos de 2

almendros (26). El objetivo del presente trabajo fue realizar un seguimiento de los dos almendros positivos, con el fin de evaluar la estabilidad del hongo en los detritos de almendros en diferentes épocas del año.

## Materiales y métodos

### Muestras

Se tomaron muestras de detritos, hojas, semillas y corteza de los dos almendros positivos, marcados 9 y 21. La toma de muestras se realizó de mayo de 1997 a julio de 1999. A partir de enero de 1998 hasta julio de 1999, se tomaron muestras de detritos de 9 almendros adicionales.

### Procesamiento de las muestras

Los detritos fueron procesados entre las 48 y las 72 h de haber sido recolectados; se suspendieron 5 g de cada muestra en 25 ml de una solución tampón fosfato (PBS), pH 7,2; se mezcló y se filtró a través de una gasa estéril. Al filtrado se le adicionaron 50 µl de una solución de antibióticos (20 U de penicilina y 40 U de estreptomina) y 100 µl de la suspensión se sembraron en cajas con agar ácido cafeico y agar semillas de *Guizotia abyssinica* (28), suplementados con antibióticos en la misma concentración descrita anteriormente. Las cajas se incubaron a 25 °C durante 10 días con observación diaria.

### Identificación y serotipificación

Las colonias oscuras, positivas para la fenol-oxidasa, se transfirieron a una caja de agar glucosado de Sabouraud. Se evaluó la morfología microscópica en preparaciones con agua destilada y con tinta china (29). El fenotipo se determinó por la producción de las enzimas ureasa y nitrato reductasa, y por el patrón de asimilación de carbohidratos con el empleo del micrométodo de API 20C AUX (*Biomerieux*, Francia) (29). La variedad se determinó por el medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (30). El serotipo se determinó por aglutinación en lámina, con antisueros preparados en el laboratorio inmunizando conejos con las levaduras inactivadas con formol (JK Kwon-Chung, comunicación personal). Posteriormente, se utilizó el estuche *Crypto-Check*, Iatron, Tokio, Japón.

**Datos de temperatura, humedad relativa y precipitación de Cúcuta**

Durante el período del estudio, estos datos se obtuvieron del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM).

**Resultados**

En los 19 meses del estudio se tomaron 160 muestras de detritos, 97 del almendro 9 y 63 del almendro 21 y en 31 (19,3%) de ellas (29 del almendro 9 y 2 del almendro 21), se aisló *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C. Las muestras de hojas, semillas y corteza, fueron negativas. En el cuadro 1 se encuentra el número de aislamientos recuperados del almendro 9 por mes de estudio. Del almendro 21 se recuperaron 2 aislamientos, uno en agosto de 1997 y el otro en enero de 1998.

De los 9 almendros adicionales, se tomaron en total 210 muestras y se logró recuperar *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C sólo de uno (marcado con el número 20) en una sola oportunidad (julio de 1999).

El rango de temperatura durante los 26 meses de estudio fue entre 27,8 y 28,8 °C, y el porcentaje de humedad relativa entre 66 y 72%, sin que se presentaran cambios importantes en estos dos parámetros. Sin embargo, los datos de precipitación anual presentaron los siguientes cambios: en 1997, 595 mm; en 1998, 811,2 mm, y en 1999, 1.341,1 mm.

**Cuadro 1.** *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C en el almendro 9: seguimiento en el tiempo por mes de estudio.

Año	Número de muestreo (mes de estudio)											
	1	2	3	4	5	6						
1997	(05)	(06)	(07)	(08)	(09)	(11)						
	+	+	+	+	-	-						
1998	(01)	(02)	(03)	(04)	(05)	(07)	(09)	(11)	(12)			
	+	+	-	+	+	+	+	+	+			
1999	(02)	(04)	(05)	(09)								
	-	+	+	-								

+: positivo; -: negativo

**Discusión**

El primer aislamiento ambiental de *C. neoformans* var *gattii* fue realizado en Australia por Ellis y Pfeiffer en 1990 (5); ellos establecieron una asociación específica de la variedad con *E. camaldulensis*; más tarde, los mismos investigadores confirmaron la asociación de la var. *gattii* con otras especies de *Eucalyptus* (19). Fuera de Australia, se ha logrado aislar la var. *gattii* serotipo B en *Eucalyptus* en California (Estados Unidos), México, Italia e India (15-17) y a partir de otros árboles como oitíes y acacias en Brasil (21,22). Adicionalmente, el serotipo B se ha relacionado con excremento de murciélagos en Brasil y de un avispero, *Polibia occidentalis*, en Uruguay (23,24).

En el estudio realizado en nuestro país en busca del hábitat de *C. neoformans* var. *gattii* en Cúcuta, se logró recuperar el primer aislamiento del serotipo C reportado en la literatura el cual estuvo asociado con almendros (*Terminalia catappa*) (26). En el seguimiento de los almendros reportados como positivos, se logró recuperar el hongo en 19,3% de las muestras, especialmente en aquéllas asociadas con uno de los árboles estudiados. Estos aislamientos se lograron solamente a partir de los detritos de los árboles, ya que las muestras de hojas, semilla y corteza que se procesaron fueron negativas. Sin embargo, no se realizó un estudio sistemático de ellas lo que quizás permitiría aclarar la relación del hongo con el árbol. Por el momento, el hecho de que la recuperación se haya realizado solamente a partir de detritos, no permite afirmar que exista una relación directa entre *C. neoformans* y el almendro, y que posiblemente en estos detritos existan los componentes necesarios para la supervivencia del hongo en el medio ambiente. Sin embargo, llama la atención que los detritos estén asociados específicamente con los almendros, cuando en nuestra experiencia con otros árboles, no ha sido posible recuperar el hongo de este material (26).

En la literatura se reporta que la época en la cual se recuperan los aislamientos a partir de *Eucalyptus* coincide con su época de floración (2); sin embargo, con los datos obtenidos en este trabajo se puede asumir que, en nuestro medio, la

recuperación del hongo no está relacionada con una época específica del año. La temperatura, la precipitación y la humedad relativa de Cúcuta, no parecen ser relevantes para el aislamiento del hongo en la naturaleza. Esto podría ser de importancia a nivel ecológico y epidemiológico, ya que el hongo, al estar presente durante todo el año, podría ser una fuente permanente de contaminación.

En este estudio, al igual que en el anterior (26), no se logró recuperar la var. *neoformans*, de los detritos de los almendros; este hallazgo difiere al informado en Brasil por el grupo de Lazera, en el que se demuestra el aislamiento de las dos variedades de *Cryptococcus* a partir de la misma fuente ambiental (22,23). Se puede sugerir, entonces, que existe una asociación específica de la var. *gattii* con los almendros, asociación que ha empezado a ser explorada por nuestro grupo. Para tal fin, se han infectado plántulas de almendro con la var. *gattii* y se ha determinado la viabilidad del hongo en la plántula; los datos preliminares señalan que el hongo sobrevive hasta por 100 días, fecha final de la observación (31).

Llama la atención que el serotipo C se siga aislando de los detritos de los almendros de Cúcuta, debido a que el serotipo prevalente en pacientes de esta ciudad es el B (27). Recientemente se ha informado en la literatura un cambio de *C. neoformans* a nivel de fenotipo (32), lo que podría sugerir que en el medio ambiente se encuentra un aislamiento poco virulento y una vez entra al hospedero podría cambiar a uno más virulento. Por lo tanto, se requieren estudios con el empleo de técnicas de biología molecular, los cuales permitirán establecer la relación de la huella molecular de los aislamientos clínicos con la de los ambientales.

### Referencias

- Mitchell TG, Perfect JR. Criptococosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995;8:515-48.
- Ellis D, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet 1990; 336:923-5.
- Wilson DE, Bennet JE, Bailey JW. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Proc Soc Exp Biol Med 1968;127:820-3.
- Wickes BL, Moores TD, Kwon-Chung KJ. Comparison of the electrophoretic karyotype and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 1994;140:543-50.
- Ellis D, Pfeiffer T. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol 1990;28:1642-4.
- Emmons C. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J Bacteriol 1951;62:685-90.
- Staib F, Schultz-Dieterich J. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages. Control of *Cryptococcus neoformans* habitats. Zbl Bakt Hyg 1984; B179:179-86.
- Littman ML, Borok R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol 1968;35:329-45.
- Littman ML, Schneierson. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excremento in New York City. Am J Hyg 1959;69:49-59.
- Emmons C. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columbia livia*). Am J Hyg 1995;62:227-32.
- Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of Sao Paulo, Brazil. Med Mycol 2000;37:385-90.
- Lazera MS, Pires EDA, Camilo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CC, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J Med Vet Mycol 1996;34:127-31.
- Pal M, Mehrotra B. Studies on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruits and vegetables Mykosen 1985;28:201-5.
- Denton J, Disalvo A. The prevalence of *Cryptococcus neoformans* in various natural habitats. Sabouradia 1968;6:213-7.
- Pfeiffer T, Ellis D. Environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. J Infect Dis 1991;163:929-30.
- Montagna MT, Viviani MA, Pulito A, Aralla C, Tortorano AM, Fiore L, Barbuti SC. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Italy. Note II. Environmental investigation related to an autochthonous clinical case in Apulia. J Mycol Med 1997;7:93-6.
- Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kausahi A, Padhye A. An isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. J Clin Microbiol 1997;35:3340-2.
- Cabral LF. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. Rev Iberoam Micol 1999;16:77-81.

19. Pfeiffer T, Ellis D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. J Med Vet Mycol 1992;30:407-8.
20. Swinne D, Bauwens L, Desmet P. More information about the natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. ISHAM Mycoses Newsletter 1992;60;4.
21. Lazera M, Nishikawa M, Salmito A, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. Med Mycol 1998;36:119-22.
22. Lazera M, Salmito A, Londero A, Trilles L, Nishikawa M, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol 2000;37:379-84.
23. Lazera M, Wanke B, Nishikawa M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J Med Vet Mycol 1993;31:449-54.
24. Gezeule E, Cale L. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a *Polybia occidentalis*. Rev Iberoam Micol 1993;10:5-6.
25. Lizarazo JF, Rodríguez MC, Ordóñez N, Vargas JJ, Castañeda E. Criptococosis meníngea en el Hospital Erasmo Meoz de Cúcuta. Acta Neurol Colomb 1995; 11:259-67.
26. Callejas A, Ordóñez N, Rodríguez MC, Castañeda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. Med Mycol 1998;36:341-4.
27. Ordóñez N, Castañeda E. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. Biomédica 1994;14: 131-9.
28. Shields AB, Ajello L. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Science 1966;151:208-9.
29. Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press; 1995. p.735-7.
30. 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.
31. Huérfano S, Castañeda A, Castañeda E. Experimental infection of almond trees (*Terminalia catappa*) with environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype C. Abstracts, 14th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Buenos Aires, Argentina; 2000. p.124.
32. Fries BC, Goldman DL, Cherniak RR, Casadevall A. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. Infect Immun 1999;67: 6076-83.