

## SUSCEPTIBILIDAD "IN VITRO" DE CEPAS DE *Cryptococcus* A 5 DROGAS ANTIFÚNGICAS

A. J. BAVA & R. NEGRONI (1)

### RESUMEN

Se estudió la susceptibilidad "in vitro" de 24 cepas de 3 especies del género **Cryptococcus** a 5 drogas antifúngicas (anfotericina B, 5 fluorocitosina, ketoconazol, itraconazol y miconazol). Las mismas se agruparon según su especie, variedad y origen de aislamiento.

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (C.I.M.) de cada droga se empleó el método de dilución en agar con el medio básico nitrogenado para levaduras, adicionado de glucosa. Se obtuvo además la media geométrica de estos valores para cada grupo y se comparó cada uno de ellos.

Los resultados obtenidos fueron homogéneos con la sola excepción de las cepas de **Cryptococcus sp** (no neoformans), en las cuales se detectaron elevados valores de C.I.M. para la 5 fluorocitosina.

**UNITERMOS:** **Cryptococcus**; Drogas antifúngicas; Susceptibilidad "in vitro".

### INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una micosis sistémica cuyo agente etiológico es una levadura capsulada: el **Cryptococcus neoformans**. Esta ha sido repetidamente aislada del medio ambiente en muestras de suelo contaminadas con excrementos de palomas<sup>1, 3, 7</sup>.

Otras especies de **Cryptococcus**, consideradas habitualmente como no patógenas se recuperaron de muestras clínicas y de tierra, contaminadas o no con excrementos de palomas<sup>3</sup> y se han señalado ocasionalmente como agentes causales de infecciones<sup>5, 6</sup>.

El estudio antigénico del polisacárido capsular de **Cryptococcus neoformans**, permitió su agrupación en 4 serotipos: A, B, C y D<sup>2</sup>. El par serotípico AD se corresponde con **Cryptococcus neoformans variedad neoformans** y el BC con la variedad **gattii** del mismo hongo<sup>11, 12</sup>.

Entre las características salientes de esta última figuran: su presencia mayoritaria en los aislamientos clínicos en determinados áreas del planeta<sup>4</sup>, la imposibilidad, hasta el presente, de su recuperación del medio ambiente y su mayor resistencia a los agentes antifúngicos, mencionada por algunos autores<sup>10</sup>.

El propósito de este trabajo es comparar la susceptibilidad "in vitro" a 5 drogas antifúngicas de cepas de **Cryptococcus**, aisladas en su gran mayoría, en nuestro medio, en los últimos 5 años. La finalidad principal es establecer si existe diferencia de sensibilidad a estas drogas entre las cepas obtenidas de pacientes y aquellas aisladas de la naturaleza y ver si a través de este estudio se podría establecer algún tipo de caracterización epidemiológica.

(1) Centro de Micología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155. Piso II. C.P. 1421. Capital Federal. Buenos Aires. Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

a) **Cepas estudiadas:** se estudiaron 24 cepas de levaduras del género *Cryptococcus*, 22 de ellas pertenecientes a la Micoteca del Centro de Micología y 2 enviadas por la Dra. Kwon Chung. Las características generales de las mismas (denominación, especie, variedad, serotipo y origen de aislamiento) se resumen en la Tabla n° 1.

b) **Preparación del inóculo:** se realizó un repique de las cepas en tubos conteniendo medio de agar miel de Sabouraud y se incubaron a 28°C durante 48 horas. Las células fueron suspendidas en solución fisiológica estéril y llevadas a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de Mac Farlan.

c) **Medio de cultivo y preparación de placas:** se utilizó agar al 2% en agua destilada adicionado de glucosa al 10%. Este medio base se fraccionó en tubos de 22x3 cm con 17 ml cada uno y se esterilizó en autoclave.

Posteriormente se colocó en baño de agua a 45°C hasta el momento de agregar el suplemento. Este último estuvo compuesto por 2 ml de Yeast Nitrogen Base (DIFCO) concentrado 10 veces (6,7 g en 100 ml de agua destilada) y 1 ml de la dilución correspondientes de antifúngico, ambos estériles.

La mezcla de la base y el suplemento se volcó sobre placas de Petri de 10 cm de diámetro y se homogeneizó con movimientos rotatorios.

TABLA 1  
Características generales de las distintas cepas de *Cryptococcus* estudiadas

CEPA	ESPECIE	VARIEDAD	ORIGEN DE AISLAMIENTO
MOY	neoformans	neoformans	L.C.R.
VAR	"	"	"
GIU	"	"	"
FER	"	"	"
RIV	"	"	"
MUÑ	"	"	"
AME	"	"	sangre
CAB M	"	"	excrementos de paloma
CAB R	"	"	" " "
LOP 1	"	"	" " "
LOP 2	"	"	" " "
ROD	"	"	" " "
ROC	"	"	" " "
PER	"	"	" " "
GAI	"	<b>gattii</b> serotipo B	L.C.R.
GAR	"	" "	"
CEPA B	"	" "	Dra. Kwon Chung (*)
CEPA C	"	" "	" " " (*)
GAG	<b>albidus</b>	<b>diffluens</b>	excrementos de palomas
GIO	"	"	" " "
EPE	"	"	" " "
SRI	"	"	" " "
CEM	<b>unigutulattus</b>	-----	tierra
BRU	<b>albidus</b>	<b>diffluens</b>	ganglio linfático

### Referencias:

(\*) cepas enviadas por la Dra. Kwon Chung.  
L.C.R.: líquido céfalorraquideo.

Una vez solidificado el medio se eliminó el agua de condensación en estufa a 37°C. Se realizaron igualmente placas de control sin antifúngico y con polietilenglicol 200.

d) **Antifúngicos utilizados:** Los solventes utilizados fueron agua destilada para anfotericina B y 5 fluorocitosina; polietilenglicol 200 para itraconazol y ketoconazol y cremofor para miconazol. A partir de las soluciones madre se hicieron diluciones en progresión geométrica de las drogas en solución fisiológica estéril, desde 1.000 hasta 2 ug/ml, para obtener en las placas concentraciones finales 20 veces menores (50 hasta 0,09 ug/ml).

e) **Inoculación de las placas:** se utilizó para este propósito un aparato del tipo del multirrepicador de Steers. Se ubicaron 0,3 ml de las suspensiones de levaduras en cada una de las oquedades del mismo. En primer lugar se inocularon los controles y seguidamente las placas conteniendo antifúngicos, de menor a mayor concentración.

f) **Lectura e interpretación de los resultados:** las placas inoculadas se incubaron a 28°C durante 48 hs y luego se realizó la lectura de las mismas. Se consideró como concentración inhibitoria mínima (C.I.M.) a la menor concentración de antifúngico que inhibió el desarrollo del hongo. Las pruebas se realizaron por duplicado.

Siguiendo los criterios adoptados por FROMTLING et al.<sup>8</sup> se obtuvo la media geométrica de los distintos grupos y se consideró como significativa una diferencia cuádruple entre los valores obtenidos.

## RESULTADOS

Los resultados fueron agrupados de la siguiente manera:

a) ***Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*** de muestras clínicas.

b) ***Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*** de materias fecales de palomas.

c) ***Cryptococcus neoformans* var. *gattii***, 2 de ellos aislados de muestras clínicas en nuestro medio y 2 enviados por la Dra. Kwon Chung.

d) ***Cryptococcus albidus* var. *diffluens*** y ***Cryptococcus unigutulattus*** aislados del medio ambiente.

e) ***Cryptococcus albidus* var. *diffluens*** aislado de muestra clínica.

En la Tabla n.º 2 se observaran los valores obtenidos con las distintas drogas.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos no muestran en la mayoría de los casos diferencias significativas entre los valores de la media geométrica de la C.I.M. de las 5 drogas en los 4 grupos establecidos. Hace excepción el de los ***Cryptococcus* sp.** (no neoformans), que muestra altos valores de C.I.M. para la 5 fluorocitosina, en comparación con los ***Cryptococcus neoformans***. La bibliografía revisada no aporta datos sobre este punto.

Observando los valores obtenidos en otros trabajos, los nuestros son comparables en el caso de la anfotericina B, la 5 fluorocitosina y el miconazol. Quizas aquellos obtenidos con ketoconazol e itraconazol se muestren un poco más elevados. Esta diferencia puede ser motivada por el uso de un medio de cultivo que se considera menos adecuado para el estudio de antifúngicos azólicos "in vitro". Sin embargo recurrimos a él por tratarse de un medio universalmente empleado para las determinaciones de la sensibilidad "in vitro" y porque no altera los resultados de la 5 fluorocitosina y de la anfotericina B.

El resultado de la cepa de ***Cryptococcus albidus* var. *diffluens*** aislado de una muestra clínica no fue tomado en cuenta por carecer de significación estadística.

## CONCLUSIONES

El estudio de la sensibilidad "in vitro" a los distintos agentes antifúngicos es tema de constante discusión. El procedimiento más utilizado para este fin es el de dilución en agar, que permite el estudio de la sensibilidad de numerosas cepas simultáneamente. Nosotros hemos elegido esta metodología ya que perseguimos un objetivo epidemiológico al comparar la sensibilidad antifúngica de ***Cryptococcus*** de diferentes orígenes de aislamiento.

TABLA 2  
Valores de la media geométrica de las C.I.M. obtenidas  
(en ug/ml)

Grupo	Nº de cepas	ITRA	KETO	MICO	AMB	5 FC
<b>Cryptococcus neoformans</b> <b>var. neoformans</b> (casos clínicos).	7	0,85 (0,19-1,56)	3,80 (1,56-6,25)	0,31 (0,10-0,39)	0,13 (0,09-0,19)	0,16 (0,09-0,39)
<b>Cryptococcus neoformans</b> <b>var. neoformans</b> (medio ambiente).	7	1,56 (0,78-3,12)	5,15 (3,12-12,5)	0,35 (0,19-0,78)	0,11 (0,09-0,19)	0,28 (0,09-0,78)
<b>Cryptococcus neoformans</b> <b>var. gattii</b>	4	0,65 (0,39-0,78)	3,71 (3,12-6,25)	0,32 (0,19-0,39)	0,19 (0,19-0,19)	0,27 (0,19-0,39)
<b>Cryptococcus sp.</b> no neofor- mans (medio ambiente)	5	0,50 (0,19-0,78)	3,58 (3,12-6,25)	0,54 (0,39-0,78)	0,28 (0,09-1,56)	> 50,00 (50,0-50,0)
<b>Cryptococcus albidus</b> (caso clínico)	1	0,39	6,25	0,39	0,09	> 50,00

**Referencias:**

ITRA: Itraconazol

KETO: ketoconazol

MICO: miconazol

AMB: anfotericina B

5 FC: 5 fluorocitosina

Entre paréntesis figuran los valores máximos y mínimos de C.I.M. obtenidos con cada una de las drogas.

Es conocido que varios factores provocan cambios importantes en los resultados obtenidos "in vitro". Son ellos el pH, concentración iónica y composición química del medio utilizado, solubilidad y distribución de la droga probada en este último, la densidad del inóculo, la fase en que se encuentra el hongo que lo conforma y el tiempo y temperatura de incubación.

No obstante los esfuerzos realizados por muchos laboratorios, los resultados no son coincidentes entre sí<sup>9</sup>. Es menester la búsqueda de una metodología sencilla que permita obtener resultados significativos desde punto de vista clínico y de fácil ejecución por los laboratorios de menor complejidad.

Teniendo en cuenta la metodología utilizada para el estudio de la sensibilidad "in vitro" de las cepas de *Cryptococcus* a distintos antifúngicos, podemos concluir lo siguiente:

1 — No hubo diferencias en la sensibilidad "in vitro" entre ambas variedades de *Cryptococcus neoformans*.

2 — No se comprobaron susceptibilidades significativamente distintas entre las cepas de *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* aislados de casos clínicos y de la naturaleza.

3 — Las cepas de *Cryptococcus sp.* (no *neoformans*) recuperadas del medio ambiente así como una de *Cryptococcus albidus var. diffluens* aislada de una paciente exhibieron valores más elevados de C.I.M. para la 5 fluorocitosina.

**SUMMARY**

**"IN VITRO" SUSCEPTIBILITY OF CRYPTOCOCCUS STRAINS TO 5 ANTIFUNGAL DRUGS.**

A comparative study of the "in vitro" susceptibility of 24 *Cryptococcus* strains to 5 antifungal

drugs (amphotericin B, 5 fluorocytosine, miconazole, itraconazole and ketoconazole), was carried out.

These strains were grouped according to species, varieties and isolation's origins. The minimum inhibitory concentration (M.I.C.) was determined by the agar dilution technique in yeast nitrogen base agar with dextrose. The mean geometrical of the M.I.C. values of each group was compared with the others.

The results obtained were homogeneous with the only exception of the "non neoformans" strains, in which, higher M.I.C. to 5 fluorocytosine values were detected.

### AGRADECIMIENTO

A la Dra. Amalia Fernández y equipo por su gentil y desinteresada colaboración.

### REFERENCIAS

1. AJELLO, L. — Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. *Amer. J. Hyg.*, 67: 72-77, 1958.
2. BASTIDE, J. M. & MALLIE, M. — Ultrastructure et biologie de *Cryptococcus neoformans*. *Bull. Soc. franc. Mycol. med.*, 15: 11-20, 1986.
3. BAVA, A. J. & NEGRONI, R. — Estudio epidemiológico sobre criptocosis en San Pedro (Buenos Aires). *Rev. argent. Micol.*, 9: 12-16, 1986.
4. BENNETT, J. E.; KWON CHUNG, K. J. & HOWARD, D. H. — Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Amer. J. Epidem.*, 105: 582-586, 1977.
5. DA CUNHA, T. & LUSINS, J. — *Cryptococcus albidus* meningitis. *Sth. med. J. (Bgham, Ala.)*, 66: 1230-1243, 1973.
6. DAMBROSI, A.; NEGRONI, R.; FAINBOIM, H. & BAVA, A. J. — Criptocosis por *Cryptococcus albidus*. *Rev. argent. Micol.*, 10: 16-19, 1987.
7. EMMONS, Ch. — Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Amer. J. Hyg.*, 62: 227-232, 1955.
8. FROMTLING, R. A.; ABRUZZO, G. K. & BULMER, G. S. — *Cryptococcus neoformans*: comparisons of "in vitro" antifungal susceptibilities of serotypes AD and BC. *Mycopathologia (Den Haag)*, 94: 27-30, 1986.
9. FROMTLING, R. A., ed. — *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents*. Barcelona, J. R. Prous Publishers, 1987.
10. HENDERSON, D. K.; EDWARDS Jr., J. E.; DISMUKES, W. E. & BENNETT, J. E. — Meningitis produced by different serotypes of *Cryptococcus neoformans*. In: Annual Meeting of American Society of Microbiology, Dallas, Tx., 1981. *Abstract. Abst. F11*.
11. KWON CHUNG, K. J. — A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 67: 1197-1200, 1975.
12. KWON CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. & RHODES, J. C. — Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48: 25-28, 1982.

Recebido para publicação em 28/3/1989.