

EN BÚSQUEDA DEL HÁBITAT DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* VAR. *GATTII* EN COLOMBIA

por

Elizabeth Castañeda*

Resumen

Castañeda, E.: En búsqueda del hábitat de *cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **25** (94): 105-114, 2001. ISSN 0370-3908.

Se analizan los estudios de tipo diagnóstico e investigativo que sobre el hongo patógeno *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y var. *gattii* se han llevado a cabo en el laboratorio de micología del INS. Se destaca la frecuencia de una variedad de este microorganismo, la var. *gattii*, en ciertas regiones del país y la severidad de la patología por ella producida. Igualmente, se describen los pasos seguidos para demostrar su hábitat, su relación con los almendros (*Terminalia catappa*), su capacidad de desarrollo en plántulas y las posibles conexiones entre la planta, *C. neoformans* y el humano.

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

Abstract

An analysis of the diagnostic and investigative studies carried out in Colombia, at the mycology laboratory at INS, on the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y var. *gattii* is presented. Emphasis is made on the frequency of one the varieties of this microorganism, the var. *gattii*, in certain regions of the country and on the severity of its clinical presentations. The steps followed to demonstrate its presence in nature, its relationship with the almond tree (*Terminalia catappa*), its capacity to grow in seedlings, and the possible connections between the plant, *C. neoformans*, and humans are also described.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, cryptococcosis, habitat, ecology.

* Laboratorio de Micología Médica. Grupo de Microbiología. Instituto Nacional de Salud (INS). Avenida Eldorado, carrera 50. E-mail: ecastaneda@hemagogus.ins.gov.co

"Por más de un siglo, *Cryptococcus neoformans* ha sido reconocido como germen patógeno para el hombre. La historia de su epidemiología, ecología, taxonomía, biología molecular, patobiología, diagnóstico y tratamiento son apenas un reflejo general de los descubrimientos realizados en el campo de la micología médica"

Casadevall, J.R. Perfect 1998. *Cryptococcus neoformans*.
ASM Press, Washington, DC

La criptococosis y su agente etiológico

El agente etiológico de la criptococosis, *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice 1894, Vuillemin 1901), una levadura perteneciente al Reino de los Hongos, presenta un teleomorfo o fase sexuada que lo clasifica en el phylum Basidiomycota, orden *Filobasidiales*, familia *Filobasidiaceae*, género *Filobasidiella* (Kwong Chung, 1975; Kwong Chung *et al.*, 1979; Aulakh *et al.*, 1981). Sin embargo, se lo conoce mejor bajo su anamorfo o fase asexual, el que lo asigna al phylum Deuteromycota, clase Blastomycetes, orden Cryptococcales, familia *Cryptococaceae*, género *Cryptococcus*. Al presente, se considera que en ambos estados de reproducción, teleomorfo y anamorfo, existen dos variedades, var. *neoformans* y var. *gattii* (Kwong Chung *et al.*, 1982). Recientemente, y con base en huellas digitales del ADN del hongo, se ha propuesto la creación de una nueva variedad, var. *grubii* (Franzot *et al.*, 1999), aún está en consideración. Existen otras especies del género *Cryptococcus* pero ellas son raramente patógenas para el hombre (Mitchell & Perfect, 1995).

Cryptococcus neoformans es una levadura esférica u ovalada, capsulada, de tamaño variable (4-20 µm), el que depende del tamaño de la cápsula. El anamorfo se reproduce por gemación única o múltiple, dando origen a las blastoconidias. La cápsula es una característica morfológica importante del hongo y está compuesta por varios polisacáridos, la glucuronoxilomanana (GXM) la galactoxilomanana y la manoproteína; el primero es el más importante pues constituye el 90% de estos productos. Las diferencias en la estructura de la GXM explican las diferencias antigénicas que dan base a la clásica separación en cinco tipos serológicos: A, B, C, D, y AD (Evans, 1950, Wilson *et al.*, 1968). Al ser reconocidas estas variedades, se determinó que la var. *neoformans* estaba conformada por los serotipos A, D y AD y la var. *gattii* por los serotipos B y C (Mitchell & Perfect, 1995).

Es importante destacar que las dos variedades presentan numerosas diferencias, siendo una de ellas la preferencia por un hospedero determinado, preferencia que, a su vez, está condicionada por el estado inmune del mismo. La var. *neoformans* afecta preferentemente a indivi-

duos inmunocomprometidos y la var. *gattii* a hospederos inmunocompetentes en los cuales, a pesar de todo, ocasiona alta morbilidad. Adicionalmente, existe una mayor dificultad en obtener una respuesta adecuada al tratamiento en los pacientes infectados con la var. *gattii* (Mitchell & Perfect, 1995). De gran importancia son también las diferencias en distribución geográfica y en hábitat; así, la var. *neoformans* tiene distribución mundial (Kwong Chung & Bennett, 1984) así como especial predilección por suelos contaminados con excretas de aves, especialmente de palomas (*Columbia livia*), (Emmons, 1951; 1955). En contraste, la var. *gattii* está limitada a regiones tropicales y subtropicales y tan sólo hace una década fue posible determinar su hábitat, asociado con ciertas especies de *Eucalyptus* y de otros árboles (Ellis & Pfeiffer, 1990a, 1990b, 1992; Pfeiffer & Ellis, 1991, 1992).

El teleomorfo se reconoce como el hongo heterotálico *Filobasidiella neoformans*, con dos variedades, var. *neoformans* y var. *bacillispora* (Kwong Chung, 1979). La pareja sexual está conformada por aislamientos tipo "α" y tipo "a", las cuales al verse desprovistas de nitrógeno y en condiciones de relativa desecación, se fusionan e inician el proceso de reproducción sexual propia de los basidiomicetos (Kwong Chung & Bennett, 1978).

Algunos datos históricos

En 1894 Sanfelice, médico italiano, logró aislar a partir de jugos de frutas, el primer aislamiento de *C. neoformans* consignado en la literatura. El observó microscópicamente una levadura capsulada que en animales de experimentación, ocasionaba lesiones seudotumorales, característica que lo llevó a denominar el aislamiento *Saccharomyces neoformans*. Un año después e independientemente, dos patólogos alemanes Busse y Buschke, diagnosticaron el primer caso de criptococosis clínicamente manifiesta, informado en la literatura; no obstante, clasificaron al agente como *S. hominis*. Posteriormente y especialmente en Europa, se diagnosticaron otros casos, cuyos agentes etiológicos recibieron diversos nombres. En 1901, Vuillemin examinó una serie de aislamientos y al no observar reproducción por las ascosporas propias del género *Saccharomyces*, clasificó los varios aislamientos en el género *Cryptococcus* (del griego, *kryptos*, escondido) creado por Kutzing en 1833 para acomodar aquellas levaduras que no poseían "endosporas". El género *Cryptococcus* fue definitivamente aceptado en 1935 después de los trabajos de Rhoda Benham con los aislamientos de Sanfelice, Busse, Buschke y otros más. Con ellos se estableció que la criptococosis era producida por una sola especie del género, con algu-

nas diferencias serológicas entre los aislamientos. Desde entonces, el agente etiológico se conoce con el binomial *Cryptococcus neoformans* (Vuillemin, Sanfelice) (Drouhet, 1997).

"...el prefijo *CRYPTO**, aunque de vieja data, continúa siendo apropiado, ya que muchos aspectos de la epidemiología de la entidad permanecen aun ocultos"

D. Pappagianis, *Bacteriol Rev*, 1967; 31:25-34

Algunos datos epidemiológicos y micológicos

El diagnóstico

En 1956, se diagnosticó en nuestro país (Lichtenberger & Fajardo, 1956) y en una autopsia, el primer caso de criptococosis; se trataba de una mujer en embarazo que murió por meningitis. Para 1975 se habían publicado en Colombia 54 casos de criptococosis, la gran mayoría de ellos confirmados por histopatología (Ordóñez *et al.*, 1998).

Los primeros 14 casos diagnosticados en el laboratorio de Micología Médica del Grupo de Microbiología del INS, datan del período de 1975 a 1980 (Ordóñez *et al.*, 1981). Los datos indicaban que 8 pacientes eran del género masculino, con un rango de edad de 17 a 69 años y quienes procedían de 7 departamentos del país. En los 17 años siguientes (1981-1998), se diagnosticaron o confirmaron en este laboratorio, 322 casos de la micosis en pacientes procedentes de 20 departamentos. Un análisis de las historias de los pacientes hasta el año de 1985 indicó que continuaba predominando el género masculino (62%), que la micosis ocurría en mayores de 20 años y que como factores de base estaban presentes el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Hodgkin y la artritis reumatoidea. (Ordóñez *et al.*, 1987; López *et al.*, 1993; Tobón *et al.*, 1996; Ordóñez *et al.*, 1996; Ordóñez *et al.*, 1998).

A partir de 1986, empezó a llamar la atención el alto número de casos de criptococosis asociados con el SIDA, ya que la proporción de pacientes VIH positivos en quienes se diagnosticaba la micosis, se había incrementado de 27% en 1990 a 80,4% en 1995 (Ordóñez & Castañeda, 1992; Ordóñez *et al.*, 1998).

El estudio del agente etiológico: las variedades, los serotipos y la pareja sexual.

En 1992, a partir de 163 aislamientos de origen clínico recuperados desde 1972, se estableció, por primera vez que en nuestro país existían las dos variedades de *C. neoformans* (Ordóñez & Castañeda, 1994). La var. *neoformans* (serotipos A y D) representaba 92,6% de los

casos y la var. *gattii* (serotipos B y C), 7,4%. Al serotipo A correspondían 92% de los casos, al serotipo B 6,8% y a los serotipos C y D, 0,6%. *C. neoformans* var. *neoformans* estuvo presente durante todos los años y todos los meses en los cuales se aisló el hongo; por el contrario, la var. *gattii* se observó solamente a partir de 1986 y en determinados meses del año. La criptococosis por la var. *neoformans* fue mas frecuente en el género masculino (67%), mientras que en las infecciones por la var. *gattii* no se observaron diferencias por género. La distribución por departamentos señaló que en Cúcuta, Norte de Santander, 5 de los 6 aislamientos de *C. neoformans* correspondían a var. *gattii*.

Este dato fue ampliado inicialmente en una publicación del grupo del Hospital Erasmo Meoz de Cúcuta (Lizarazo *et al.*, 1995). Adicionalmente en una revisión reciente, (Lizarazo *et al.*, 2000), se analizaron las historias de 20 pacientes con afección sistémica por *C. neoformans* var. *gattii*, diagnosticados entre 1988 y 1999. Se estableció que 15 pacientes eran hombres y 5 mujeres, con edad promedio de 32 años siendo 4 de ellos menores de 12 años. Los pacientes procedían de 8 departamentos pero 12 eran de Norte de Santander. Como dato interesante, 80% de los pacientes fueron considerados inmunocompetentes. El curso de la enfermedad fue severo ya que 7 (35%) pacientes murieron un mes después del diagnóstico y otros 7 sufrieron pérdida de la agudeza visual y/o de la visión. En ese trabajo se destacó la severidad de la afección por la var. *gattii*, su mortalidad y la morbilidad, lo cual señalaba la necesidad del pronto reconocimiento de la variedad infectante.

Un estudio, realizado en conjunto con el laboratorio de Micología de la CIB con el fin de determinar, in vitro, la susceptibilidad de las dos variedades a los antimicóticos, señaló que si bien todos los aislamientos de la var. *gattii* eran sensibles, lo eran en concentraciones denominadas sensibles pero dosis dependiente, lo que podría explicar la mayor dificultad para lograr que el tratamiento fuera exitoso (De Bedout *et al.*, 1999).

Con el fin de documentar la pareja sexual de los aislamientos colombianos, se realizó un estudio en el que se estableció que 55 de los 74 (74%) aislamientos de *C. neoformans* var. *neoformans* pertenecían a la pareja sexual "α". Sin embargo, no se logró determinar la pareja sexual en los 7 aislamientos de *C. neoformans* var. *gattii* estudiados (Ordóñez, *et al.*, 1998).

La encuesta

En 1997, iniciamos, en asociación con el laboratorio de la CIB, un programa denominado "Encuesta

epidemiológica sobre la criptococosis" (Castañeda *et al.*, 2000). La encuesta estaba dirigida a coleccionar información sobre los pacientes colombianos infectados con *C. neoformans* y sobre los correspondientes serotipos del hongo. De julio de 1997 a diciembre de 1999 habían sido remitidas 159 historias; adicionalmente y en forma retrospectiva, se diligenciaron 54 encuestas de pacientes diagnosticados en el período 1988 a 1996, lo que permitió analizar un total de 213 encuestas. Los datos más sobresalientes fueron los siguientes: 158 (74,2%) pacientes, 140 hombres y 18 mujeres tenían SIDA; 43 (20,2%) eran VIH (-) y en 12 (5,6%) se desconocía el dato. Como se desprende de lo anterior, el factor de riesgo predominante en el período analizado era la infección por el VIH (74,2%), sin embargo, se identificaron otros factores en 15% de los pacientes, tales como el uso de esteroides (4,2%), la presencia de una enfermedad autoinmune (2,8%) o de tumores (2,3%), así como trasplantes de órganos (1,9%), diabetes (1,4%), cirrosis (0,5%) y otros (7,4%).

Los 115 aislamientos recuperados de pacientes con SIDA correspondieron a la var. *neoformans*, serotipo A, en tanto que en los 42 pacientes VIH (-), se identificó la var. *neoformans*, serotipo A, en 24 (57%) y la var. *gattii*, serotipo B, en 18 (43%). Ocho de los 10 aislamientos de pacientes en los que el diagnóstico de VIH era desconocido, demostraron ser var. *neoformans*, serotipo A mientras que 2 fueron var. *gattii*, serotipo B. De los 134 aislamientos en los que se determinó la CIM, se halló resistencia a la anfotericina B en 2, al itraconazol en 1 y sensibilidad dosis dependiente al fluconazol en 4. El tratamiento inicial de los pacientes había sido realizado con anfotericina B en 60% y combinado con fluconazol en 20% de los casos.

Debido a que la criptococosis no es una enfermedad de notificación obligatoria en nuestro país, los datos de la encuesta anterior representan una primera aproximación hacia la recolección de información confiable sobre esta patología.

Comentarios sobre la criptococosis y su agente etiológico.

La experiencia del grupo de Microbiología del INS en esta patología, permite destacar los siguientes hechos: al presente en nuestro país, al igual que en otras partes del mundo, el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la criptococosis es la infección por el VIH. Sin embargo, es importante anotar que los factores de riesgo tradicionales siguen estando presentes en los pacientes VIH negativos, si bien con menor frecuencia. La variedad predominante del hongo es la var. *neoformans*, serotipo A, lo que refleja su mayor frecuencia en hospederos inmuno-

comprometidos. No obstante, la morbi-mortalidad ocasionada por la var. *gattii*, serotipo B, en pacientes inmunocompetentes no es despreciable y señala la importancia del estudio micológico inicial con el fin de establecer la variedad que afecta al paciente. Igualmente, se destaca la distribución geográfica de la var. *gattii*, predominante en Norte de Santander, en tanto que la var. *neoformans* se ha aislado en todos los departamentos de los cuales se han recibido aislamientos.

"Debe recordarse, sin embargo, que la investigación es un proceso de maduración, de reflexión y raras veces, de impulso inmediato. Por regla general, una idea no se concreta de la noche a la mañana y pueden pasar varios años antes de su materialización"

A. Restrepo, Editorial, Biomédica 1998;18:247-248

La incursión en la ecología (oikos: casa, logos: estudio, "el estudio de la vida en casa"). De Sanfelice (1894) a Ellis (1990).

El hábitat de *C. neoformans* var. *neoformans*

El aislamiento realizado en 1895 por Sanfelice a partir de jugos de frutas, constituye el primero de una fuente ambiental, el que hoy se reconoce como *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D (Drouhet, 1997). Sin embargo, la verdadera historia de los estudios ecológicos de *C. neoformans* se inicia con el informe de su recuperación del medio ambiente, a partir de muestras de suelo contaminadas con excretas de palomas (Emmons, 1951, 1955); este hallazgo estableció el hábitat de *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo A. Años más tarde, a partir de 1980, el Grupo de Microbiología del INS incursionó en este campo y reprodujo el hallazgo de Emmons, como lo han hecho numerosos autores (Staib & Schulz-Dieterich, 1984; Drouhet, 1997; Mitchell & Perfect, 1995). Fue así como se recuperó la var. *neoformans*, serotipo A, de 69% del total de 75 muestras recogidas en palomares de (Santa Fe de) Bogotá (Corrales *et al.*, 1981). En este trabajo se estudió una población con alta exposición a excrementos de palomas y un grupo control de personas no expuestas y se determinó la presencia de anticuerpos contra el hongo, sin que se revelara su presencia incrementada en los expuestos.

El hábitat de la var. *gattii*.

Con respecto a la var. *gattii*, su hábitat era desconocido hasta 1990, año en que el grupo australiano de Ellis y Pfeiffer, señalaron como los detritos de *Eucalyptus camaldulensis* eran reservorios de ella. Este hallazgo fue de gran significado ya que explicaba la fuente natural de infec-

ción de la variedad que ocasionaba el mayor número de casos clínicos en Australia (Ellis & Pfeiffer, 1990b). En posteriores investigaciones de Lazera *et al.*, 2000 se postula a los árboles como el nicho ecológico de las dos variedades.

1. Eucaliptos: estandarización de procedimientos.

En el laboratorio del INS se decidió entonces realizar un estudio tendiente a desarrollar la metodología adecuada al procesamiento de muestras vegetales y a identificar las especies de *Cryptococcus* asociadas con ellas. Fue así como se estudiaron 21 árboles ubicados en 5 zonas diferentes de Bogotá y a partir de 100 muestras, se recuperaron 27 aislamientos de *Cryptococcus* pertenecientes a 9 especies, 2 de ellos *C. neoformans* var. *neoformans* (Duarte *et al.*, 1994).

2. Eucaliptos: estudio en un parque de Bogotá.

Con base en la información consignada en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional sobre la presencia de un espécimen de *E. camaldulensis* en un parque de Bogotá, se diseñó un estudio con el fin de establecer la posible asociación de varios árboles del género con especies de *Cryptococcus*. Se recolectaron, mensualmente durante 2 años, 426 muestras de madera de 19 *Eucalyptus*. Estas se procesaron con los procedimientos estandarizados previamente. Fue posible recuperar 17 aislamientos de especies de *Cryptococcus*: 14 *C. laurentii*, 2 *C. neoformans* var. *neoformans* y 1 *C. albidus*. Si bien se estableció la asociación del hongo con los eucaliptos, no se logró recuperar la variedad *gattii* de ninguna de las especies del género *Eucalyptus* ubicadas e el parque. (Castañeda & Castañeda, 2001)

3. Cúcuta: eucaliptos y otros árboles.

Como se mencionó anteriormente, la información clínica disponible señalaba que, en Cúcuta, Norte de Santander, 60% de los casos de criptococosis en pacientes sin SIDA, eran ocasionados por la var. *gattii*. Por tal motivo, se inició un estudio sistemático sobre el hábitat de la var. *gattii* en esta ciudad. La muestra, seleccionada por tamaño y sitio, consistió en detritos de un cierto número y varias clases de árboles (*Eucalyptus*, *Cassia*, *Moquilia*), así como de otros árboles nativos de la región. Durante 11 meses consecutivos se recolectaron muestras alrededor de las casas de siete pacientes con infección por la var. *gattii*, residentes en el área urbana y de cinco sitios en las afueras de la ciudad. De las 1.736 muestras procesadas se aislaron 186 levaduras del género *Cryptococcus*, 40 de las cuales correspondieron a *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo A, 121 a *C. laurentii* y 25 a *C. albidus* (Ordóñez *et al.*, 1997).

4. Cúcuta: almendros.

Debido a que los almendros (*Terminalia catappa*) son comunes en el área, este género se adicionó a la lista de los otros árboles estudiados. Inicialmente, por un período de 5 meses, se analizaron detritos, material vegetal y muestras de aire. De 68 almendros y específicamente, del detrito de dos de ellos (almendros 9 y 21), fue posible aislar *C. neoformans* var. *gattii*, serotipo C (Callejas *et al.*, 1998). Fue éste el primer informe en la literatura sobre el aislamiento del serotipo C a partir del ambiente.

El hallazgo fue confirmado posteriormente ya que al seguir los dos almendros positivos, fue posible repetir el aislamiento, así como evaluar el tiempo de permanencia del hongo en los detritos durante diversas épocas del año. En total, se tomaron muestras de los dos árboles positivos por espacio de 26 meses, y se estudiaron 9 almendros adicionales. De un total de 160 muestras obtenidas de los dos almendros, 31 (19,3%) fueron positivas para *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C (Figura 1), así como una muestra de 1 de los 9 almendros adicionales. Estos hallazgos sugieren que el almendro podría jugar algún papel como planta intermediaria para la var. *gattii*, y además, que esta variedad es capaz de permanecer por un tiempo prolongado en el área, ya que se logró recuperarla en diferentes meses a lo largo de todo el estudio (Castañeda *et al.*, 2001). El hallazgo repetido del serotipo C en asociación con detritos de *T. catappa*, apoya la hipótesis australiana sobre un nicho para *C. neoformans* var. *gattii*, en el medio ambiente

Se acepta que la determinación del hábitat de un agente infeccioso es fundamental en el conocimiento de su fisiopatología y, por lo tanto, estos resultados tan solo indican que requerimos de más conocimiento para esta-

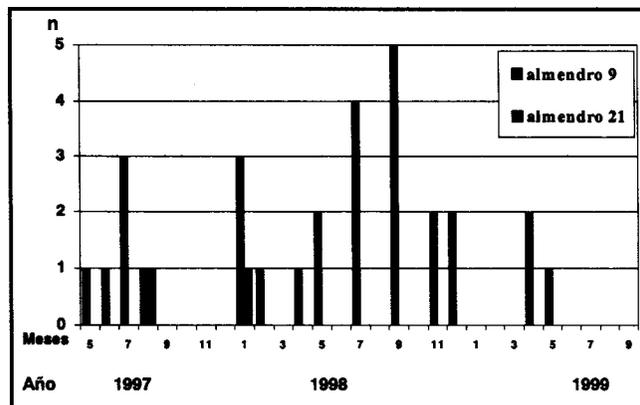


Figura 1. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotipo C: recuperación mensual a partir de los almendros positivos 9 y 21.

blecer la relación ecológica precisa entre las variedades de *C. neoformans* y el hospedero. Sin embargo, los hallazgos mencionados permiten considerar una posible relación entre la infección del hombre y su exposición a los ambientes donde se ha demostrado la existencia del hongo. Estudios de tipo molecular podrían dar respuesta a estos planteamientos.

Estudio de los aislamientos ambientales, serotipo C

Con el fin de caracterizar los aislamientos ambientales serotipo C, se han empleado una serie de marcadores fenotípicos como son la morfología, el tamaño de colonias, levaduras y cápsula, el establecimiento de curvas de crecimiento, la producción de melanina, así como su patogenicidad para ratones BALB/c (Castañeda *et al.*, 1999).

1. *Morfología y tamaño de las colonias.* Se estudiaron 13 aislamientos ambientales serotipo C y controles representados por aislamientos ambientales serotipos A y B, y clínicos serotipos A, B, C y D. La morfología y el tamaño de las colonias se determinaron después de 7 días de crecimiento en agar glucosado de Sabouraud. Los datos de la morfología revelaron que todas las colonias era lisas, húmedas y no mucoides, con excepción de un aislamiento ambiental serotipo B empleado como control, caracterizado por colonias mucoides. El fenómeno de "switching," que se presenta con una frecuencia de 1×10^4 (Fries *et al.*, 1999), el cual parece estar implicado en virulencia, es objeto de estudio en la actualidad.

En todos los aislamientos, el tamaño de las colonias fue homogéneo; así, en el serotipo C, varió de 5,15 a 8,51mm con un promedio de $7,1 \text{ mm} \pm 0,92$. En los controles correspondientes el tamaño fue de 5,24 a 10,15, promedio $7,55 \pm 1,5$ para los ambientales, y de 5,33 a 8,92, promedio $6,58 \pm 1,13$, para los clínicos (Figura 2).

2. *Producción de melanina.* Esta fue determinada en el mismo número de aislamientos, utilizando un medio suplementado con L-dopa (3,4dihidroxi-fenilalanina), un sustrato para la enzima fenol oxidasa. En *C. neoformans* y con base en su especificidad, esta enzima ha sido clasificada como una lacasa, y constituye uno de los factores de virulencia más estudiados. Entre los fenómenos biológicos de defensa asociados con la producción de melanina, se encuentran la protección contra oxidantes, la integridad de la pared celular, la protección contra la luz UV, la inhibición de la fagocitosis y un incremento en la carga negativa. Por lo anterior, se acepta que la melanina constituye un mecanismo que protege al hongo del medio ambiente y del hospedero humano. En los experimentos

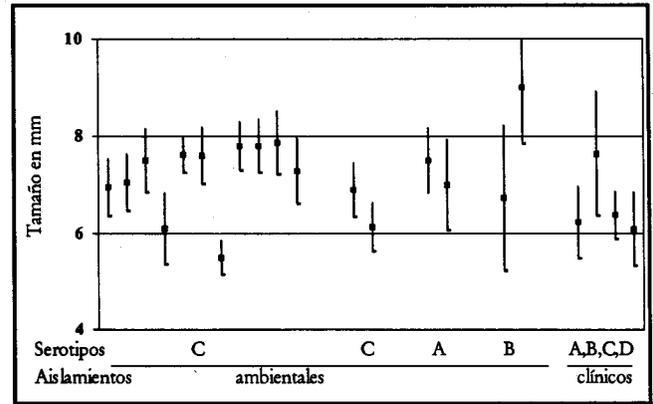


Figura 2. *Cryptococcus neoformans*: tamaño de las colonias en determinación realizada después de 7 días de crecimiento en agar glucosado de Sabouraud. Aislamientos estudiados: ambientales serotipo C del almendro 9: I-755, I-557, I-559, I-617, I-684, I-731, I-737, I-760, I-818, I-826, I-859; del almendro 21: I-618, I-682. Controles ambientales serotipo A, I-583, I-857, serotipo B I-453, B-4506. Controles clínicos, serotipo A I-855, serotipo B I-881, serotipo C I-78, serotipo D I-20.

anotados, la melanina fue producida a partir del sexto día de incubación en 3 de los 11 aislamientos ambientales serotipo C, y en el día 21, fecha final de la observación, en los restantes. La producción fue clasificada cualitativamente por intensidad como débil (en 1/13 aislamientos serotipo C), intermedia (en 11/13) y fuerte (en 1/13) (Figura 3). En el futuro, el uso de un procedimiento cuantitativo podría establecer la importancia de este factor en la interacción levadura-hábitat.

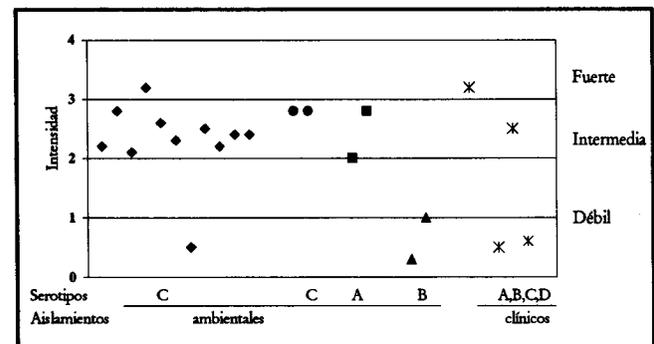


Figura 3. *Cryptococcus neoformans*: Producción de melanina en determinación realizada después de 21 días de crecimiento en agar con L-dopa. Los aislamientos estudiados fueron los mismos mencionados en la leyenda de la figura 2.

3. *Tamaño de las levaduras y de la cápsula. Curvas de crecimiento.* Estas determinaciones fueron establecidas para 3 aislamientos ambientales del serotipo C, uno del A, uno del B y un aislamiento clínico serotipo A. Los tamaños se estudiaron a partir de un crecimiento de 48h a 30°C en agitación en un medio líquido glucosado. La observación microscópica se hizo en preparaciones con tinta china con objetivo de inmersión, se midieron un total de 20 levaduras por aislamiento. Para las levaduras de serotipo C el tamaño de la levadura varió de 3,7 a 8,39 μm (promedio 6,06 \pm 1,74) y el de la cápsula de 0,44 \pm 1,01 μm (promedio 0,72 \pm 0,26). Los controles ambientales presentaron un promedio de 7,99 \pm 3,08 μm para las levaduras y 1,25 \pm 0,86 μm para la cápsula (Figura 4).

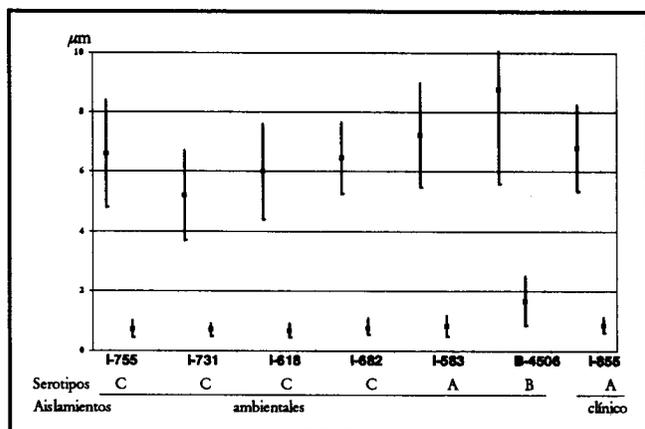


Figura 4. *Cryptococcus neoformans*: Determinación del tamaño de la levadura y de la cápsula. Proceso realizado a partir de un crecimiento de 48h a 30 °C, en agitación en un medio líquido glucosado. La observación microscópica se hizo en una preparación con tinta china y objetivo 100X. Se estudiaron aislamientos ambientales serotipo C obtenidos del almendro 9: I-755, I-731 y del almendro 21: I-618, I-682. Controles ambientales serotipo A, I-583, serotipo B, B-4506. Controles clínicos, serotipo A I-855,

El crecimiento en medio líquido fue medido tanto por absorción a 600 nm como por unidades formadoras de colonia (UFC). Ambas mediciones demostraron que todos los aislamientos alcanzaban su máximo crecimiento a las 54 h. (Figura 5).

4. *Virulencia de los aislamientos serotipo C.* La virulencia fue evaluada en ratones BALB/c, inoculados vía intravenosa con 1×10^6 y 5×10^6 UFC. Se emplearon 2 aislamientos serotipo C y como control, un aislamiento ambiental serotipo B de patogenidad conocida. Se estableció que con los aislamientos del serotipo C, todos los

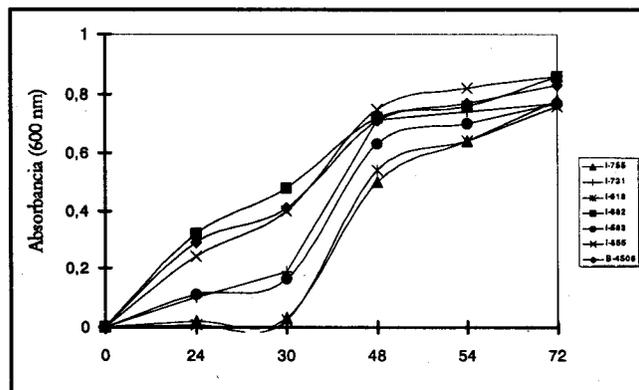


Figura 5. Curvas de crecimiento de los varios aislamientos de *Cryptococcus neoformans*. El crecimiento en medio líquido glucosado fue medido por absorción a 600 nm. Los aislamientos estudiados fueron los mismos mencionados en la leyenda de la figura 4.

Tabla 1. Virulencia de los aislamientos ambientales de *Cryptococcus neoformans*, serotipo C, evaluada en ratones BALB/c, inoculados intravenosamente con 10^6 y 5×10^6 UFC.

Aislamiento	Inoculo	Sobrevida	Recuperación	
	X 10^6	%	cerebro	bazo
Experimento 1		30 días		
I-755	5	100	-	+
I-680	5	100	-	+
B-4506	5	50	+	+
Experimento 2		60 días		
I-755pa*	1	100	+	+
I-680pa	1	100	+	+
I-680pa	5	80	+	+

* pa = pase por animal

ratones sobrevivieron hasta la terminación del experimento, 30 días post-inoculación. Sin embargo, la autopsia reveló lesiones en bazo y cerebro que indicaban el establecimiento del proceso infeccioso. El mismo resultado se obtuvo en un segundo experimento en el cual se inocularon cepas que habían sido pasadas por animal, procedimiento que se emplea para incrementar la virulencia (Tabla 1). Sería interesante explorar si la baja virulencia para los ratones del serotipo C pudiera estar relacionada con el escaso número de casos clínicos debidos a este serogrupo (Mitchell & Perfect, 1995).

Los almendros: hospederos experimentales

El informe del aislamiento de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendros (*T. catappa*)

(Callejas *et al.*, 1998), motivó la realización de un estudio encaminado a evaluar la supervivencia de *C. neoformans* en plántulas de almendros. Con tal fin y en una experiencia preliminar, se infectaron 30 plántulas en el tallo. El material vegetal fue procesado con diferentes técnicas y en diferentes períodos post-infección. No se observó alteración macroscópica ni microscópica en las plántulas infectadas. Sin embargo, *C. neoformans* permaneció viable hasta 100 días después de la infección, lo que se pudo establecer con la técnica de recuperación de hongos endofitos (Figura 6). (Huérffano *et al.*, 2000). Estos datos permitieron una primera aproximación a la comprensión de la relación entre el hongo y una posible planta hospedera y señalaron la necesidad de iniciar estudios que permitieran establecer si esta asociación podría conferirle a la planta el carácter de reservorio.

Trabajo actual

Actualmente se están aplicando algunas técnicas de biología molecular en el estudio de los aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* var. *gattii* con el fin de establecer sus relaciones genéticas y obtener un conocimiento más preciso de la relación parásito-hospedero. Adicionalmente, se está estandarizando la técnica de amplificación del ADN (PCR) en muestras del medio ambiente, la que ayudará a detectar, con mayor sensibilidad, la presencia del hongo en su hábitat. Este sería un paso fundamental en el estudio de la fisiopatología de esta importante micosis.



Figura 6. Tallo de una plántula de *Terminalia catappa*: Examen directo 100 días después de la infección con levaduras de *Cryptococcus neoformans*, serotipo C. Preparación con agua destilada en la que se observan blastoconidias del hongo (100X). Técnica de hongos endofíticos.

"Mientras más profundizamos en el conocimiento del hábitat más difíciles resultan de explicar las interacciones con el hospedero. Es decir, los caminos de investigación se siguen abriendo"

David H. Ellis, 2000.

Agradecimientos

La autora expresa su profundo reconocimiento a aquellas personas que en una u otra forma, colaboraron en las varias etapas del estudio. Sin su interés y consagración no hubiese sido posible obtener los resultados que hoy se presentan. Ellas son:

Integrantes del grupo de trabajo del Instituto Nacional de Salud: Nelly Ordóñez, , Alexandra Castañeda, Sandra Huérffano, Aída Callejas, Magaly Chinchilla, Edilma Torrado, Jeannette Castillo Luisa Marcela Londoño, Livia Bustos, Carmen Sofía Corrales, Gloria Estela Moreno y Angela Duarte

Colaboradores externos:

María Claudia Rodríguez y Jairo Lizarazo del Hospital Erasmo Meoz, Cúcuta.

Catalina de Bedout y Myrtha Arango, de la Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín.

Y especialmente al incondicional apoyo de la doctora Angela Restrepo Moreno.

Parte del estudio ecológico fue realizado con el apoyo económico de Colciencias, Contrato 2104-01-173-95, CT 294-95.

Bibliografía

- Aulakh, H.M., Straus, S. & Kwon-Chung, K.J. 1981. Genetic relatedness of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) and *Filobasidiella bacillispora* (*Cryptococcus bacillisporus*) as determined by deoxyribonucleic acid base composition and sequence homology studies. *Int J Sys Bacteriol* 31: 97-183.
- Callejas, A., Ordóñez, N., Rodríguez, M.C. & Castañeda, E. 1998. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol* 36:341-344.
- Castañeda, A. & Castañeda, E. 2001. Aislamiento de especies de *Cryptococcus* asociadas con *Eucalyptus* en un parque de Bogotá. Aceptado para publicación *Biomédica* 21(1).
- Castañeda, A., Huérffano S, Rodríguez M.C. & Castañeda E. 2001. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendros. Aceptado para publicación *Biomédica* 21(1).
- Castañeda, E., Ordóñez, N., Callejas, A., Rodríguez, M.C., Castañeda, A. & Huérffano, S. 1999. In search of the habitat of

- Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Colombia. 4th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. London.
- Castañeda, E., Torrado, E., Arango, M., de Bedout, C., Tobón, A.M., Restrepo, A. & Grupo colombiano de estudio de la criptococosis.** 2000. Criptococosis en Colombia: estudio interinstitucional. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 5:115-119.
- Corrales, C.S., Ordóñez, N., Londoño, L.M. & Castañeda, E.** 1981. Determinación de anticuerpos contra *Cryptococcus neoformans* en un grupo de colmbófilos. *Biomédica* 7: 100-104.
- De Bedout, C., Ordóñez, N., Gómez, B.L., Arango, M., Castañeda, E. & Restrepo, A.** 1999. Sensibilidad a los antimicóticos de los aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y var. *gattii*. *Rev Iberoam Micol* 16:36-39.
- Drouhet E.** 1997. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. *J Mycol Méd* 7:10-27.
- Duarte, A., Ordóñez, N. & Castañeda, E.** 1994. Asociación de levaduras del género *Cryptococcus* con especies de *Eucalyptus* en Santa Fe de Bogotá. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36: 125-130.
- Ellis, D.H. & Pfeiffer, T.J.** 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 28: 1642-1644.
- Ellis, D.H. & Pfeiffer, T.J.** 1990. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* 336: 923-925.
- Ellis, D.H. & Pfeiffer, T.J.** 1992. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol* 8:321-325.
- Emmons, C.W.** 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol* 62: 685-690.
- Emmons, C.W.** 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columbia livia*). *Am J Hyg* 62:227-232.
- Evans, E.E.** 1950. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serological classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J Immunol* 64: 423-430.
- Franzot, S.P., Salkin, I. & Casadevall, A.** 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 37: 838-840.
- Fries, B.C., Goldman, D.L., Cherniak, R.R. & Casadevall, A.** 1999. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect Immun* 67:6076-6083.
- Huérffano, S., Castañeda, A. & Castañeda, E.** 2000. Experimental infection of almond trees (*Terminalia catappa*) with environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C. Abstract's book of the 14th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Buenos Aires, Argentina.
- Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E.** 1978. Distribution of a and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol* 108:337-339.
- Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E.** 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 120:123-130.
- Kwon-Chung, K.J.** 1975. A new genus, *Filobasidiella* the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 67:1197-1200.
- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E. & Theodore, T.** 1979. *Cryptococcus bacillisporus* sp. Nov. serotype B, C of *Cryptococcus neoformans*. *Int J Sys Bacteriol* 28:616-620.
- Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I. & Bennet, J.E.** 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
- Lazera, M., Salmito, A., Londero, A., Trilles, L., Nishikawa, M. & Wanke, B.** 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 37: 379-384.
- Lizarazo, J., Mendoza, M., Palacios, D., Vallejo, A., Bustamante, A., Ojeda, E., Restrepo, A. & Castañeda, E.** 2000. Criptococosis ocasionada por *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*. *Acta Méd Colomb*; 25:171-178.
- Lizarazo, J.F., Rodríguez, M.C., Ordóñez, N., Vargas, J.J. & Castañeda, E.** 1995. Criptococosis meníngea en el Hospital Erasmo Meoz de Cúcuta. *Acta Neurol Colomb*. 11:259-267.
- López, S., Ordóñez, N. & Castañeda, E.** 1993. Criptococosis con manifestaciones cutáneas. *Acta Méd Colomb*. 18: 229-233.
- Lichtenberger, E. & Fajardo, L.** 1956. Un caso de criptococosis. *Instant Med* 21:31.
- Mitchell, T. & Perfect, J.R.** 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 8:515-548.
- Ordóñez, N. & Castañeda, E.** 1992. La criptococosis y su agente etiológico. *Médicas UIS* 6: 207-215.
- Ordóñez, N. & Castañeda, E.** 1994. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. *Biomédica* 14:131-139.
- Ordóñez, N., Rodríguez, M.C., Callejas, A. & Castañeda, E.** 1997. Search for the habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a northeast city in Colombia. Preliminary data. Abstract's book of the 13th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Salsomaggiore Terme, Parma, Italia.
- Ordóñez, N., Castañeda, E. & Guzmán, M.** 1981. Criptococosis. Estudio de catorce casos con diagnóstico comprobado por el laboratorio. *Biomédica* 1: 87-93.
- Ordóñez, N., Castillo, J. & Moreno, G.S.** 1987. Criptococosis: diagnóstico por el laboratorio. *Biomédica* 7:37-40.
- Ordóñez, N., Chinchilla, M., Torrado, E. & Castañeda, E.** 1998. El despertar del gigante: lo que hemos aprendido sobre la criptococosis y su agente etiológico. Instituto Nacional de Salud, 1917-1987. Una historia, un compromiso. Toro G, Hernández CA, Raad J (eds). Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá: 262-269.
- Ordóñez, N., Torrado, E. & Castañeda, E.** 1996. Criptococosis meníngea de 1990 a 1995. Hallazgos de laboratorio. *Biomédica* 16: 93-97.

- Pfeiffer, T.J. & Ellis, D.H.** 1991. Environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. *J Infect Dis* 163: 929-930.
- Pfeiffer, T.J. & Ellis, D.H.** 1992. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* 30: 407-408.
- Staib, F. & Schulz-Dieterich, J.** 1984. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages. Control of *Cryptococcus neoformans* habitats. *Zbl Bakt Hyg* 179: 179-186.
- Tobón, A.M., Ordóñez, N., Castillo, J., Espinal, D., Franco, L., Gómez, I., Arango, M., Castañeda, E. & Restrepo, A.** 1996. Micosis sistémicas en niños. *Actualizaciones Pediátricas* 6:59-65.
- Wilson, D.E., Bennet, J.E. & Bailey, J.W.** 1968. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med* 127: 820-3.