

COMUNICACIÓN BREVE

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en aislamientos clínicos cubanos

Lic. Carlos M. Fernández Andreu,¹ Dr. Gerardo Martínez Machín,² Dra. María Teresa Illnait Zaragoza,³ Lic. Mayda Perurena Lancha⁴ y Lic. Mario González Miranda⁵

RESUMEN

Mediante la utilización del medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), se estudiaron 50 cepas de *Cryptococcus neoformans* de origen clínico. El 56 % de las cepas se aisló de pacientes con sida y el 16 % pertenecía a pacientes sometidos a trasplante renal. El 90 % de las cepas se obtuvo a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo, lo que se corresponde con la forma clásica de presentación de la criptococosis. Todas las cepas se identificaron como *C. neoformans* var. *neoformans*, lo que coincide con reportes anteriores realizados en Cuba. Con el conocimiento de las variedades de *C. neoformans* se pueden hacer inferencias sobre la epidemiología, la clínica y la respuesta al tratamiento de la criptococosis.

Descriptores DeCS: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/aislamiento & purificación; SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA/líquido cefalorraquídeo; TRANSPLANTACION DE RIÑON; AZUL DE BROMOTIMOL; CUBA.

Con el aumento del número de casos de criptococosis al nivel mundial, especialmente causado por su asociación con el sida, se ha incrementado también el interés en profundizar en el conocimiento de su agente causal, la levadura encapsulada *Cryptococcus neoformans*. En la actualidad se conocen 2 variedades de esta especie, *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii*, las cuales presentan propiedades bioquímicas, serológicas y ecológicas que permiten diferenciarlas entre sí.^{1,2}

En 1982, *Kwon-Chung* y otros propusieron un medio de cultivo que permitía la diferenciación de ambas variedades con alta especificidad, se basaba en la capacidad de la variedad *gattii* de resistir y crecer en

presencia de L-canavanina y utilizar la glicina como una única fuente de carbono.³ Desde entonces, este medio de cultivo, conocido como CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol), ha sido empleado por diferentes autores para la diferenciación sencilla y específica de las 2 variedades.^{2,4,5}

Mediante la utilización de este medio, fueron estudiadas 50 cepas de *C. neoformans* aisladas de pacientes hospitalizados en diferentes centros asistenciales del país en el período comprendido entre 1986 y 1996. Estas cepas habían sido identificadas previamente hasta el nivel de especie por la presencia de cápsula, producción de ureasa y fenoloxidasa, asimilación de inositol, no fermentación de

¹ Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

² Especialista en Microbiología. Investigador Agregado.

³ Especialista en Microbiología.

⁴ Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora.

⁵ Licenciado en Microbiología.

carbohidratos, ausencia de filamentos en agar harina de maíz y crecimiento a 37 °C.¹

Del total de cepas, 28 (56 %) procedían de pacientes con sida, 8 (16 %) de receptores de trasplantes renales y 14 (28 %) de pacientes con otras enfermedades de base no precisadas. El 74 % fue aislado a partir de 1990, lo que está muy en relación con el desarrollo de la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana en Cuba. El líquido cefalorraquídeo fue la muestra a partir de la cual se aisló el 90 % de las cepas, tanto en los pacientes con sida como en el resto de los enfermos (tabla).

TABLA. Procedencia de las cepas estudiadas

Año	No.	Pacientes con sida		Pacientes con trasplante renal		Otros pacientes	
		LCR	Otras muestras	LCR	Otras muestras	LCR	Otras muestras
1986-							
-1989	13	1	-	5	-	5	2 ^a
1990	2	-	-	1	-	1	-
1991	3	-	-	-	-	3	-
1992	8	6	-	2	-	-	-
1993	7	6	1 ^b	-	-	-	-
1994	4	3	-	-	-	1	-
1995	4	3	1 ^c	-	-	-	-
1996	96	1 ^d	-	-	2	-	-
Total	50	25	3	8	-	12	2

a: Piel y meninges; b: lavado broncoalveolar; c: orina; d: sangre. LCR: Líquido cefalorraquídeo.

El medio CGB fue preparado según *Kwon-Chung* y otros.³ La prueba se consideró positiva al producirse un cambio de color amarillo (pH 5,8) a azul intenso (pH > 7,0) en el medio de cultivo inoculado, en los primeros 5 d de incubación a 28 °C. Se emplearon como controles cepas de referencia de *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii*.

Todas las cepas estudiadas fueron identificadas como *C. neoformans* var. *neoformans* al no producirse ningún cambio de color en el medio.

Hasta el presente todas las cepas de *C. neoformans* identificadas en Cuba pertenecen a la variedad *neoformans*. A diferencia de otros estudios realizados anteriormente con cepas cubanas,^{6,7} en el presente trabajo, 28 de las cepas procedían de pacientes con sida. Se ha señalado que el 99 % de los casos de criptococosis en pacientes con sida tiene como agente causal a *C. neoformans* var. *neoformans*. En la literatura médica mundial sólo habían sido reportados 8 casos causados por la variedad *gattii*; sin embargo, en fecha reciente fueron informados otros 7 casos, australianos.⁸ Esta última variedad muestra una marcada predilección por el huésped inmunocompetente, por lo que ha sido

señalado su carácter de verdadero patógeno más que de un patógeno oportunista.⁴

La L-canavanina actúa como un inhibidor metabólico de aquellas enzimas que contienen L-arginina, altera sus estructuras terciarias y cuaternarias, y por consiguiente la actividad biológica de tales proteínas. De esta forma, la L-canavanina resulta tóxica para una gran variedad de microorganismos. Pero, la resistencia de *C. neoformans* var. *gattii* se ha atribuido a la presencia de un sistema capaz de degradar la L-canavanina y convertirla en compuestos no tóxicos.⁹

La identificación de las variedades de *C. neoformans* puede convertirse en una útil herramienta para conocer las posibles fuentes de infección. El hábitat natural de *C. neoformans* var. *neoformans* desde hace muchos años ha estado asociado con palomares u otros lugares donde haya acumulación de excretas de aves. Sin embargo, recientemente se ha podido confirmar la presencia de esta variedad en huecos de troncos de árboles con evidente degradación de la lignina, lo que pudiera modificar los conocimientos actuales de la epidemiología de esta micosis.¹⁰ Por otra parte, sólo a partir de 1990 se ha podido conocer la relación de *C. neoformans* var. *gattii* con material vegetal vinculado con diferentes especies de *Eucalyptus*.¹¹

C. neoformans var. *neoformans*, a diferencia de *C. neoformans* var. *gattii*, es sensible a la L-canavanina y a bajas concentraciones de cicloheximida; es incapaz de utilizar la glicina como única fuente de carbono e incapaz de utilizar la D-prolina y el D-triptófano como fuentes nitrogenadas.¹ La variedad *neoformans* agrupa a los serotipos A y D, mientras que a la variedad *gattii* pertenecen los serotipos B y C. Los estados perfectos o sexuales de ambas variedades son *Filobasidiella neoformans* (*C. neoformans* var. *neoformans*) y *F. bacillisporea* (*C. neoformans* var. *gattii*). *C. neoformans* var. *neoformans* tiene una amplia distribución geográfica, mientras que la variedad *gattii* se limita a algunas zonas tropicales y subtropicales.¹

Además de las diferencias bioquímicas, serológicas y ecológicas, con sus implicaciones epidemiológicas, entre las variedades de *C. neoformans* existen importantes diferencias clínicas relacionadas con la patogenicidad de la cepa y la respuesta al tratamiento,⁴ todo lo cual hace que la determinación de estas variedades se convierta en una necesidad actual de los laboratorios de micología médica

SUMMARY

50 strains of *Cryptococcus neoformans* of clinical origin were studied by using the canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) medium. 56 % of the strains were isolated from AIDS patients,

and 16 % belonged to patients with kidney transplantation. 90 % of the samples were obtained from the samples of cerebrospinal fluid, which corresponded to the classical form of presentation of cryptococcosis. All the strains were identified as *C. neoformans* var. *neoformans*, coinciding with previous reports made in Cuba. Knowing the varieties of *C. neoformans*, inferences can be drawn on the epidemiology, clinics and response to the treatment of cryptococcosis.

Subject headings: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/ isolation & purifications; ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME/cerebrospinal fluid; KIDNEY TRANSPLANTATION; BROMOTHYMOL BLUE; CUBA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):515-48.
2. Kwon-Chung KJ, Pfeiffer T, Chang YC, Wickes BL, Mitchell D, Stern JJ. Molecular biology of *Cryptococcus neoformans* and therapy of cryptococcosis. *J Med Vet Mycol* 1994;32(Suppl 1):407-15.
3. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved 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.
4. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 1995;21:28-34.
5. Ellis D, Pfeiffer T, Ruma P, Brownlee A, Chen S, Sorrell T. Distribution and frequency of *C. neoformans* var. *gattii* among the species of *Eucalyptus*. En: Program and Abstracts of 3rd. International Conference on *Cryptococcus* and *Cryptococcosis*; 1996 Sept 22-26; Institut Pasteur, Paris, 1996:47-8.
6. Fernández Andreu C, Martínez Machín G, Álvarez Bernald LP, Rodríguez Morales R, Álvarez Herrera C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated in Havana City. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85(5):245.
7. Fernández Andreu C, Martínez Machín G, Menéndez de San Pedro J, Oramas Rodríguez B. Identificación de variedades de *Cryptococcus neoformans* mediante la utilización de medios de cultivo. *Rev Cubana Med Trop* 1991;43(2):100-3.
8. Marriott DJE, Speed BR, Spelman D, Shaw D, French M, Harkness JL. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in Australian patients: a review of seven cases. En: Program and Abstracts of 3rd. International Conference on *Cryptococcus* and *Cryptococcosis*; 1996 Sept 22-26; Institut Pasteur, Paris, 1996:180.
9. Polacheck I, Kwon-Chung KJ. Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29:468-73.
10. Lazéra MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J Med Vet Mycol* 1996;34(2):127-31.
11. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990;28: 1642-4.

Recibido: 31 de enero de 1997. Aprobado: 22 de noviembre de 1997.

Lic. *Carlos M. Fernández Andreu*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.