

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Utilidad de la D-prolina en la diferenciación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*

Dr. Gerardo Martínez Machín,¹ Dra. Lisset Barrial de la Rosa,² Lic. María T. Illnait Zaragoza,³ Lic. Iliana del C. Valdés Hernández,⁴ Lic. Carlos M. Fernández Andreu,⁵ Lic. Mayda R. Perurena Lancha,⁶ Jorge L. Polo Leal⁷ y Dianeya Mendoza Llanes⁸

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo entre la asimilación de la D-prolina y el crecimiento en medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) utilizados para la clasificación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*. En las 86 cepas estudiadas, 100 % de coincidencia entre ambos métodos, permitió afirmar que 95,34 % pertenecían a la var. *neoformans* y el resto (4,65 %) a la var. *gattii*. Los resultados obtenidos corroboraron que todos los aislamientos clínicos autóctonos, hasta el presente, corresponden a la var. *neoformans* y permitieron sugerir el uso de la D-prolina para la evaluación inicial de las cepas, como un método alternativo y sencillo que presentó, en estas condiciones, alta coincidencia con el método de referencia (crecimiento en CGB).

DeCS: CRIPTOCOCOSIS/ etiología; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/ aislamiento&purificación; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/ clasificación; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/ crecimiento y desarrollo; MEDIOS DE CULTIVO; CANAVANINA, AZUL DE BROMOTIMOL/ clasificación.

Aunque se conocen 38 especies incluidas dentro del género *Cryptococcus*, el agente causal responsable de la mayoría de los casos de criptococosis humana es la levadura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, de la cual han sido descritas 2 variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D y AD) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C), ambas patógenas al hombre. Estas presentan diferencias significativas en su bioquímica, genética, antigenicidad, epidemiología, interacción con el sistema inmune del hospedero al cual infectan, comportamiento clínico y respuesta al tratamiento.¹

Basándose en el comportamiento bioquímico de ambas variedades, se han diseñado varios medios de cultivo que permiten su separación como el CDB (creatinina-dextrosa-azul de bromotimol), el GCP (glicina-cicloheximida-rojo fenol) y el CGB (L-canavanina-glicina-azul de bromotimol). También han sido descritos otros métodos con este fin como la asimilación de la D-prolina y el D-triptófano.²⁻⁴

Por la importancia que tiene conocer la variedad que prevalece en una región dada para la comprensión de la epidemiología de la enfermedad en esa área y en menor cuantía, para proyectar

Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Agregado. Profesor Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Especialista de I Grado en Microbiología. IPK.

³ Máster en Bacteriología-Micología Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

⁴ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora. IPK.

⁵ Máster en Microbiología. Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

⁶ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

⁷ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciado en Microbiología. Parque Zoológico Nacional.

⁸ Técnico en Química Industrial. IPK.

una adecuada conducta terapéutica, los autores de este trabajo se propusieron comparar, en las condiciones cubanas, la asimilación de la D-prolina y el crecimiento en CGB (método de referencia) para clasificar en variedades 86 cepas de *C. neoformans* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK).

Se estudiaron un total de 86 cepas de las cuales 13 procedían de EE. UU. y Venezuela. El resto estuvo constituido por 72 aislamientos clínicos de humanos y 1 de origen animal obtenidos en Cuba. Todas las cepas se encontraban conservadas en agua destilada estéril a temperatura ambiente y habían sido previamente identificadas y caracterizadas como *C. neoformans* según los procedimientos establecidos.⁵

Para la utilización de la D-prolina como única fuente de nitrógeno, se procedió según lo ya descrito. La lectura e interpretación de las placas se realizó después de 5 d de incubación a 25-28 °C; considerándose como positiva (var. *gattii*) cuando se obtuvo crecimiento abundante alrededor del disco impregnado con D-prolina, y como negativa (var. *neoformans*) cuando no se obtuvo crecimiento.^{4,6}

Como controles se utilizaron 4 cepas de *C. neoformans* provenientes de la Unidad de Micología del Instituto Pasteur, París (NIH 18A 1267 del serotipo A, NIH 28B 1208 del serotipo B, NIH 18C 1209 del serotipo C y NIH 52 del serotipo D).

Las cepas fueron inoculadas paralelamente en placas con medio CGB y se incubaron a 25-28 °C durante 7 d con la realización de lecturas diarias para detectar el posible cambio de color del medio. La prueba se consideró positiva al producirse un cambio de color del amarillo (pH 5,8) al azul intenso (pH > 7,0).^{3,6}

Existió 100 % de coincidencia entre ambos métodos al analizar los resultados obtenidos en las 86 cepas estudiadas, 82 (95,34 %) pertenecían a la var. *neoformans* y 4 (4,65 %) a la var. *gattii*. Todos los aislamientos autóctonos obtenidos de humanos (72) correspondieron a la var. *neoformans* y la cepa de origen animal a la var. *gattii*. Del resto, otras 3 pertenecieron a esta última variedad (tabla).

TABLA. Variedades de *Cryptococcus neoformans* según procedencia de las cepas

	Cubanas Humano	Animal *	Extranjeras** Humano	Total
<i>C. neoformans</i> var <i>neoformans</i>	72	-	10	82
<i>C. neoformans</i> var <i>gattii</i>	-	1	3	4
Total	72	1	13	86

* Aislada de un *Acinonyx jubatus* (cheeta) del Parque Zoológico Nacional.

** Procedentes de Venezuela y EE. UU.

Estudios previos realizados en Cuba, en los que se utilizó el medio CGB para clasificar en variedades aislamientos clínicos de esta levadura, mostraron que 100 % correspondían a la var. *neoformans*.^{7,8} Este resultado se mantiene en este estudio para un mayor número de cepas. En cuanto a la de origen animal, se confirmó que pertenecía al serotipo B (doctor Torres-Rodríguez, Barcelona) y constituye el primer aislamiento de la var. *gattii* en el país aunque está aún por definir si, es o no una cepa autóctona (datos no publicados). Los otros aislamientos de esta variedad procedían de países donde ha sido reportada como agente etiológico de criptococosis.¹

La alta especificidad del CGB en la diferenciación de las variedades de *C. neoformans* ha sido el principal aval para que se le reconozca como método de referencia. Su funcionamiento está basado en la capacidad de *C. neoformans* var. *gattii* de ser resistente a la L-canavanina y utilizar la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno.⁹ La incorporación de la L-canavanina a las proteínas, en lugar de la arginina, produce alteraciones de las estructuras terciarias y cuaternarias y por consiguiente, pérdida de sus propiedades biológicas lo cual impide a *C. neoformans* var. *neoformans* crecer en el medio CGB. La resistencia de *C. neoformans* var. *gattii* se ha atribuido a la presencia de un sistema enzimático capaz de degradar la L-canavanina y convertirla en compuestos no tóxicos; de esta manera sobrevive y utiliza la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, liberando amonio que es responsable del cambio de color en el medio de cultivo.^{3,7}

El método que utiliza la D-prolina como única fuente de nitrógeno, propuesto en 1987 por *Dufait* y otros, está basado solamente en un parámetro fisiológico.⁴ La posibilidad de 5 % de resultados falsos negativos en la identificación de la var. *gattii* con esta prueba refuerza el valor del medio CGB como el método de elección en los laboratorios de micología.⁶ Sin embargo, la complejidad de elaboración, el tiempo necesario para la lectura definitiva y mayor costo del medio CGB han favorecido la utilización de la D-prolina como prueba útil en el *screening* de un gran número de cepas y para la obtención de resultados rápidos.^{1,9} Esto, unido a los reportes recientes de cepas patógenas de la var. *neoformans* resistentes a la L canavanina,¹⁰⁻¹¹ deben consagrar su empleo, como un método simultáneo al de referencia, cuando se pretenda conocer a qué variedad pertenece un aislamiento dado.

La validación y estandarización del método de la D-prolina, en las condiciones cubanas, es una herramienta de gran utilidad que garantiza el estudio de nuevos aislamientos y permite, a través de la identificación de las variedades, obtener valiosa información relativa a la posible fuente de infección; así como a realizar inferencias sobre el posible potencial patógeno y por consiguiente, sobre el comportamiento clínico y la respuesta a la terapéutica de los pacientes afectados. La var. *neoformans*, con una distribución mundial, ha sido históricamente aislada de las excretas de aves y constituye abrumadora mayoría entre los aislamientos obtenidos en pacientes con SIDA. La var. *gattii*, por su parte, está restringida a climas tropicales y subtropicales, se asocia con materia vegetal procedente de diferentes especies de *Eucalyptus* y rara vez causa enfermedad en pacientes con SIDA aun en áreas endémicas.

SUMMARY

A comparative study was conducted between the assimilation of D-proline and the growth on canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) medium used for the classification of the varieties of *Cryptococcus neoformans*. In the 86 studied strains, 100 % of

coincidence between both methods allowed to affirm that 95.34 % corresponded to the *neoformans* var. and the rest (4.65 %) to the *gattii* var. The results obtained corroborated that all the autoctonus clinical isolations up to the present correspond to the *neoformans* var. and made possible to suggest the use of D-proline for the initial evaluation of strains, as an alternative and simple method that presented under these conditions high coincidence with the reference method (growth in CGB).

Subject headings: CRYPTOCOCCOSIS/ etiology; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/ isolation&purification; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/ classification; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/ growth and development; CULTURE MEDIA; CANAVANINE, BROMOTHYMOL BLUE/ classification.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Casadevall A, Perfect JR. Human Cryptococcosis. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC: Ed. ASM Press;1998:407-56.
2. Salkin IF, Hurd NJ. New medium of differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs. J Clin Microbiol 1982;15(1):169-71.
3. Kwon-Chung KJ, Polachek I, Bennett 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(3):535-7.
4. Dufait R, Velhor R, De Vroey C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D -proline assimilation. Mycosen 1987;30(10):483.
5. McGinnis MR. Laboratory Handbook of Medical Mycology. London LTD: Academic Press, Inc; 1980.
6. Nishikawa MM, Sant'Anna OD, Lazera MS, Wanke B. Use of D-proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. J Med Vet Mycol 1996;34:365-6.
7. Fernández Andreu C, Martínez Machín G, Alvarez Bernal L, Rodríguez Morales R, Alvarez Herrera C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated in Havana City. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990;85(2):245.
8. Fernández Andreu C, Martínez Machín G, Illnait Zaragozaí MT, Perurena Lancha M, González Miranda M. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* en aislamientos clínicos cubanos. Rev Cubana Med Trop 1998;50(2):167-9.
9. Polachek I, Kwon-Chung KJ. Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 1986;29(3):468-73.
10. Khan ZU, AL-Anezi AA, ChandyR, Xu J. Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine – resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var *grubii*. J Med Microbiol 2003;52:271-5.

Recibido: 30 de abril de 2003. Aprobado: 30 de septiembre de 2003.

Dr. Gerardo Martínez Machín. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: gerardo@ipk.sld.cu