

ARTÍCULOS ORIGINALES

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, MONTERÍA, COLOMBIA

Identificación presuntiva de *Cryptococcus gattii* aislado de *Terminalia catappa* en Montería, Córdoba, Colombia

Orfa Inés Contreras Martínez,¹ María Paulina Aycardi Morinelli,² Jany Luz Alarcón Furnieles,³ Aparicio Manuel Jaraba Ramos⁴

RESUMEN

Introducción: los miembros del complejo *Cryptococcus neoformans*, son la causa de criptococosis en humanos y animales. La infección en humanos es adquirida por la inhalación de los propágulos presentes en el ambiente, por esta razón es de gran importancia el estudio de su hábitat. **Objetivo:** determinar la relación ecológica de *Cryptococcus gattii* con árboles de *Terminalia catappa* presentes en la zona urbana de la ciudad de Montería, Colombia. **Métodos:** se seleccionaron 163 árboles de *Terminalia catappa* de los cuales se tomaron muestras de corteza, hojas, flores, fruto y suelo circundante. El aislamiento se realizó utilizando el medio de agar semillas de *Guizotia abyssinica*, la identificación se hizo mediante pruebas morfológicas y fisiológicas y la variedad se determinó con las pruebas de L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), D-prolina y D-triptofano. **Resultados:** se obtuvieron 9,050 UFC/g con características de *Cryptococcus* spp. De ellas, 5,795 UFC/g correspondieron presuntivamente a *Cryptococcus gattii*. El mayor porcentaje de aislamientos se encontró en flores, seguido por corteza y fruto, con tamaños celulares y capsulares pequeños. Estos aislamientos fueron más frecuentes en el sur de la ciudad, seguido por la zona centro y en menor porcentaje por la zona norte. **Conclusiones:** los hallazgos muestran una estrecha relación entre *Cryptococcus gattii* y *Terminalia catappa*. Este estudio es el primero que se hace en la ciudad de Montería. Los resultados brindan información valiosa para la comprensión y el análisis sobre la epidemiología de la criptococosis en la ciudad de Montería, Colombia.

Palabras clave: *Cryptococcus gattii*, *Terminalia catappa*, hábitat, propágulos, ambiente.

INTRODUCCIÓN

El complejo *Cryptococcus neoformans* comprende levaduras encapsuladas que se reproducen por gemación. Esta levadura puede ocasionar enfermedad tanto a personas inmunocomprometidas como a inmunocompetentes. Pruebas moleculares han permitido establecer la existencia

de dos especies: *Cryptococcus neoformans* (serotipos A, D y el híbrido AD) y *Cryptococcus gattii* (serotipos B y C).¹⁻³ La criptococosis causada por miembros del complejo *C. neoformans*, es una enfermedad que afecta inicialmente al pulmón y que puede diseminarse al sistema nervioso central causando meningoencefalitis. Su diseminación hematogena puede provocar lesiones

¹ Magíster en Ciencias en Microbiología. Especialista en Microbiología Médica. Profesora de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Ciencias Básicas e Ingenierías, Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

² Magíster en Biología. Especialista en Ecología. Profesora de Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Básicas e Ingenierías, Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

³ Bióloga. Facultad de Ciencias Básicas e Ingenierías, Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

⁴ Biólogo. Facultad de Ciencias Básicas e Ingenierías, Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

en corazón, hígado, tubo digestivo, próstata, riñones, ojos, huesos, piel, entre otros órganos.⁴ El incremento en el número de pacientes inmunocomprometidos, en especial pacientes con sida, ha traído como consecuencia una mayor incidencia de las infecciones por el complejo *C. neoformans*.^{4,5}

El hábitat de *C. gattii* se ha relacionado con varias especies de *Eucalyptus* y árboles de almendro (*Terminalia catappa*).^{2,6-8} Este último es utilizado con frecuencia como ornamental en la ciudad de Montería. A pesar de la existencia de importantes reservorios naturales de la levadura en el medio ambiente, la amplia distribución y cobertura de árboles de *T. catappa* en el perímetro urbano de la ciudad y el incremento acelerado de casos clínicos por criptococosis asociados a sida en el municipio de Montería, no existen estudios enfocados a establecer la presencia e incidencia de esta levadura en la región. La secretaría de salud municipal de Montería, entre 2005 y 2007, registró casos de criptococosis en 10 % de la población infectada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), con un incremento de 2,8 % de los casos entre 2008 y 2009 (Guevara A. Departamento Administrativo de Salud de Montería, 2010. Comunicación personal).

El objetivo de este trabajo fue establecer la presencia y distribución de *C. gattii* en muestras ambientales de *T. catappa* en el perímetro urbano de la ciudad de Montería. Estos resultados se remitirán a los servicios epidemiológicos del departamento de Córdoba y del país, para capacitar y orientar a las personas en la aplicación de medidas preventivas hacia el control de la infección por *C. gattii*.

MÉTODOS

Descripción geográfica de la ciudad de Montería: es la capital del departamento de Córdoba, Colombia, se encuentra ubicada en la zona del medio Sinú, a 8° 53' latitud norte y 75° y 53' de longitud al oeste de Greenwich. La ciudad está ubicada a 20 m.s.n.m. Su clima es cálido, con una temperatura entre 28 y 35 °C, y humedad relativa de 85 % con una precipitación pluvial de 1 200 a 2 500 mm anuales. En la figura 1 se muestra la ubicación geográfica de la ciudad, se resaltan las zonas de estudio. En la tabla se muestran los barrios estudiados, distribuidos en 9 comunas.

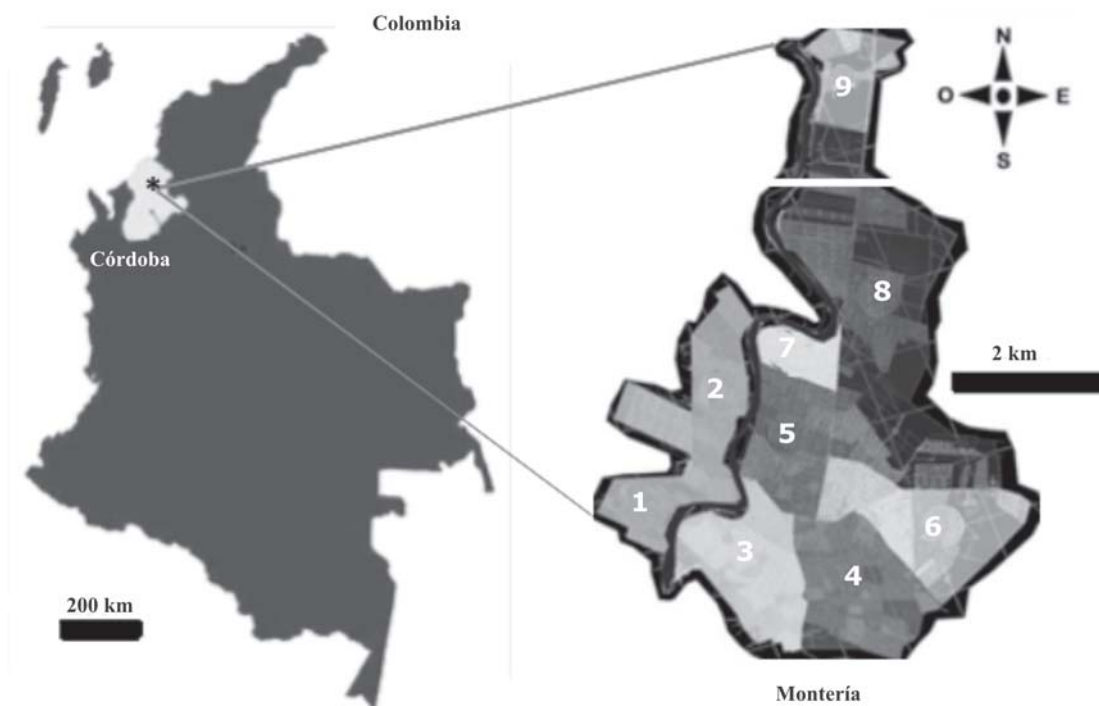


Fig. 1. Ubicación geográfica del departamento de Córdoba (Colombia), la ciudad de Montería y distribución de las nueve comunas en la zona urbana.

Tabla. Distribución de barrios estudiados por comuna de la ciudad de Montería y número de muestras recolectadas

Comuna	Barrios	Número de árboles	Número de muestras por barrio	Número de muestras por comuna
1	Rancho Grande	10	50	105
	Nueva Holanda	3	15	
	La Rivera	8	40	
2	Tambo	5	25	150
	Juan XXIII	10	50	
	Minuto de Dios	13	65	
3	Casita Nueva	2	10	130
	Santafé	5	25	
	Brisas del Sinú	6	30	
4	La Granja	15	75	50
	Pablo Sexto	2	10	
	Guadalajara	4	20	
5	Boston	2	10	25
	Urbanización América	2	10	
	14 de Julio	1	5	
6	Los Álamos	1	5	125
	Pasatiempo	3	15	
	Villa Ana	1	5	
7	Canta Claro	15	75	30
	Seis de Marzo	7	35	
	El Diamante	2	10	
8	Sucre	4	20	145
	Los Laureles	2	10	
	San Francisco	5	25	
9	Los Bongos	1	5	55
	Los Ángeles	1	5	
	Ranchos del Inat	20	100	
Total	Castilla la Nueva	2	10	815
	7 de Mayo	6	30	
	Nuevo Bosque	5	25	
Total	30	163	815	815

Recolección y procesamiento de muestras: entre los meses de septiembre de 2008 y septiembre de 2009 se recolectaron 815 muestras de 100 g cada una, comprendidas entre hojas, flores, frutos, corteza y suelo, a partir de 163 árboles de *T. cattapa* ubicados en el perímetro urbano de la ciudad de Montería. Se tomaron 3 muestras de cada una de las partes del árbol, para un total de 2 445. Las muestras de suelo superficial se recogieron a 50 cm alrededor del tallo. Las muestras de corteza se tomaron a una altura de 1,5 m del suelo, teniendo en cuenta las partes de corteza con ranuras y oquedades. Las hojas, flores y frutos se recolectaron al azar. Las muestras se transportaron al laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, donde se les determinó el pH en un potenciómetro digital, resuspendiendo 1 g de cada muestra en 10 mL de solución de CaCl₂ (0,1M). Luego se procesaron por separa-

do, previo lavado con agua destilada estéril. Posteriormente las muestras se fragmentaron y maceraron en mortero (excepto las de suelo). Se resuspendieron 5 g de cada una en 25 mL de PBS (pH 7,3); se mezclaron durante 30 min y se filtraron a través de una gasa estéril. Al filtrado se le adicionó 50 µL de una solución con 20 U de penicilina y 40 U de estreptomina (GIBCO BRL); se inocularon 100 µL de este filtrado en medio agar semillas de niger (*Guizotia abyssinica*) suplementado con bifenil 0,1 %. El medio se incubó a 28 °C durante 72 h, luego de las cuales se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g).⁶⁻⁸

Identificación: a las células con crecimiento típico, colonias color marrón oscuro en el medio selectivo agar *G. abyssinica*, se les realizó observación microscópica con tinta china⁶ y se evaluó la producción de ureasa.⁹ En cada uno de los filtrados se realizaron 20 mediciones del tamaño celular y capsular, las cuales fueron promediadas. Posteriormente se hizo la prueba de asimilación y fermentación de azúcares, mediante el kit API 20C AUX (BioMérieux, Francia), para la identificación bioquímica de la levadura. La termotolerancia fue evaluada a temperaturas entre 37 y 42 °C durante 72 h.^{6,7} La variedad se determinó con el medio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB)^{10,11} y evaluando su capacidad de asimilación y utilización de los aminoácidos D-prolina y D-triptofano como fuente de nitrógeno, a concentraciones de 0,01; 0,015; 0,02; 0,025 y 0,030 mg/mL para cada uno.¹²⁻¹⁴

Análisis estadístico: los datos se analizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurión versión 15.2; se realizó un análisis de varianzas no paramétrico. La distribución de la levadura en el perímetro urbano de la ciudad fue determinada teniendo en cuenta su presencia por zonas (Norte, Centro y Sur). La diferencia entre las zonas estudiadas se hizo por pruebas de rango múltiple, mediante la diferencia mínima significativa de Fischer (LDS) y el análisis de contraste.

RESULTADOS

De las 2 445 muestras de *T. cattapa* procesadas, *C. gattii* se aisló a partir de 217, que correspondió

a 8,9 % de las muestras. La temperatura ambiental promedio en los sitios de muestreo durante todo el año, estuvo entre 26 y 28 °C. La densidad de la población fue de 9 050 UFC/g de *Cryptococcus* spp. De ellos, 5 795 UFC/g correspondieron presuntivamente a *C. gattii*. La observación microscópica realizada con la técnica de tinta china, confirmó la presencia de levaduras capsuladas. El tamaño celular encontrado resultó de $2,93 \pm 0,55 \mu\text{m}$ y el tamaño capsular de $1,50 \pm 0,38 \mu\text{m}$. El pH de todas las muestras osciló entre 4 y 7.

Todos los aislamientos tuvieron actividad ureasa positiva y respondieron al perfil bioquímico asignado para esta levadura. La diferenciación bioquímica de la variedad se comprobó por su crecimiento y modificación del medio CGB. Además, se observó crecimiento abundante alrededor de los discos impregnados con D-prolina y D-triptofano en todas las concentraciones ensayadas. El ensayo de termotolerancia reveló crecimiento en el

rango de temperatura evaluado. La ANOVA mostró que existe diferencia significativa ($p=0,00001$) en el crecimiento de la levadura para los diferentes microhábitats (flor, corteza, hoja, fruto y suelo). El gráfico de medias con intervalos LSD a 95 % de confianza, mostrado en la figura 2, indicó una mayor proporción de aislamientos en flor y corteza en comparación con las demás partes del árbol estudiadas.

En cuanto a la distribución de la levadura en el perímetro urbano de la ciudad, un ANOVA mostró diferencias significativas entre las zonas estudiadas ($p=0,01$), con mayor proporción de aislamientos en el Sur, seguido por la zona Centro y finalmente la zona Norte. Las pruebas de rango múltiple, mediante la diferencia mínima significativa de Fischer (LDS), indicaron que la zona Centro y Sur fueron grupos homogéneos. Además, mediante contraste se observó una diferencia significativa entre Norte-Centro y Norte-Sur (Fig. 3).

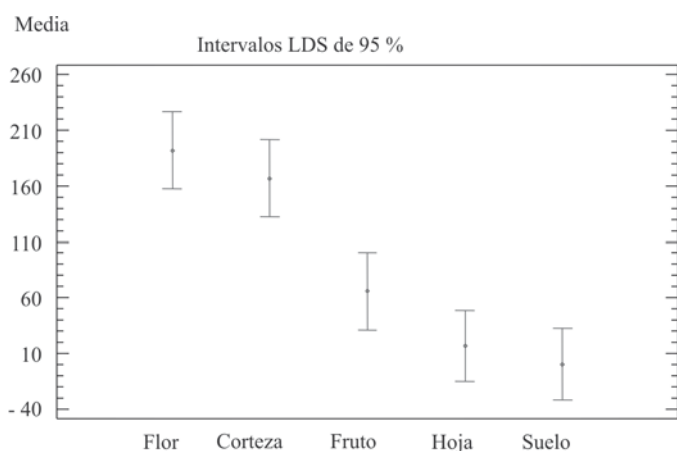


Fig. 2. Medias con intervalos LDS (diferencia mínima significativa de Fischer) de 95 %, que evidencian la distribución de aislamientos de *Cryptococcus gattii* en las distintas partes del árbol estudiadas.

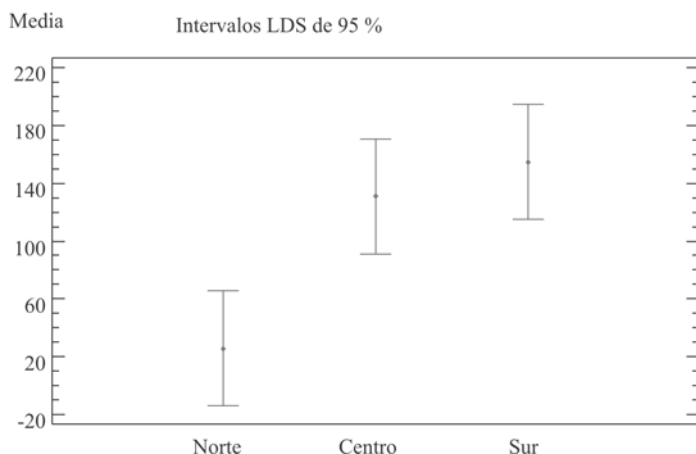


Fig. 3. Medias con intervalos LDS (diferencia mínima significativa de Fischer) de 95 %, que evidencian la distribución de aislamientos de *Cryptococcus gattii* en las zonas estudiadas en la ciudad de Montería, Colombia.

DISCUSIÓN

Este estudio se destaca como el primer informe acerca del aislamiento presuntivo de *C. gattii*, a partir de muestras ambientales de *T. catappa* en Montería, departamento de Córdoba, Colombia. Los lugares que se seleccionaron para el estudio son vías de comunicación con un alto grado de flujo vehicular dentro del perímetro urbano de la ciudad, donde los árboles de *T. catappa* están ampliamente distribuidos y son utilizados alrededor de viviendas como ornamento y para sombrío.

Los resultados reportan por primera vez la presencia de *C. gattii* en el ambiente de la ciudad de Montería. El hecho de encontrar *C. gattii*, en muestras de *T. catappa* coincide con resultados que indican su presencia en estos árboles.⁶ Según los resultados, estos árboles sirven como nicho ecológico apropiado para la supervivencia de la levadura en el ambiente, lo que podría representar un foco de infección para el hombre y los animales en la ciudad. Las muestras con mayor porcentaje de aislados fueron las de flor y corteza, probablemente, por la presencia en estos órganos, de compuestos polifenólicos como taninos y lignina, que sirven como sustrato a la levadura, tal como lo reportan otros estudios.¹⁵ Este trabajo, también arrojó un gran porcentaje (26 %) de aislados obtenidos a partir del fruto de *T. catappa*, lo cual es un dato importante si se tiene en cuenta que en esta región el fruto maduro es comestible.

Las preparaciones con tinta china mostraron células tipo levaduriformes con cápsulas pequeñas, que coinciden con observaciones realizadas en otros estudios, en árboles de *Eucalyptus*, donde se encontraron promedios capsulares similares.⁸ Un tamaño microscópico menor que 4 μm en *C. gattii* se considera infeccioso; partículas de estos diámetros alcanzan los alveolos pulmonares y pueden iniciar ciclos infecciosos.^{6,8} Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados de este trabajo permiten sugerir, igualmente, que esta levadura podría iniciar ciclos infecciosos.

De acuerdo con el amplio rango de pH (4 a 7) en que se encontraron las muestras, los resultados del presente trabajo indican que esta variable no es un determinante del hábitat del hongo. De igual modo se encontró termotolerancia, que es una condición básica de patogenicidad de estas levaduras,

tal como lo describen otros estudios, con reportes de aislamientos recuperados en escalas amplias de pH y termotolerantes.^{6,8} Los aislamientos tuvieron actividad ureasa positiva, lo que concuerda con resultados previamente reportados.⁹ La enzima ureasa regula el pH, facilitando el establecimiento del hongo en el huésped, lo cual hace más evidente la relación entre el árbol y la levadura.¹⁶

De igual forma, estos resultados muestran la capacidad de las levaduras de crecer y modificar el medio CGB. La resistencia de *C. gattii* a L-canavanina se atribuye a la presencia de un sistema enzimático capaz de degradarla 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.¹⁷ Por su parte, *C. neoformans* no puede degradar esta sustancia, lo cual es una de las características que la diferencia de esta levadura.⁸ Además, los aislamientos también crecieron en medios con D-prolina y D-triptofano, lo que corrobora los resultados encontrados mediante el empleo del medio CGB para la identificación de *C. gattii*.

La distribución de la levadura *C. gattii* en el casco urbano de la ciudad de Montería, mostró mayor proporción de aislamientos en el Sur y Centro de la ciudad, seguido por la zona Norte. La recolección de muestras en la zona Sur y Centro fue entre los meses de abril a julio, en los cuales se presentó una mayor precipitación de lluvias, que ocasionó una mayor humedad y acumulación de detritos; con esto una mayor proliferación de la levadura, porque después de las lluvias los árboles de almendro tienen un alto grado de floración que facilita la dispersión de la levadura. Además, los árboles estudiados en la zona Sur y Centro presentaron mayor grado de madurez, por consiguiente, más tejidos lignificados y carotenoides, lo que pudo haber influido en los resultados; a diferencia con la zona Norte, donde la recolección de las muestras fue en época de verano y los árboles estudiados mucho más jóvenes, con cortezas más lisas y menor cantidad de ranuras y oquedades.

Estos hallazgos representan el primer informe del aislamiento de *C. gattii*, a partir de fuentes ambientales en el departamento de Córdoba. Son los primeros datos concretos que se obtienen en cuanto a su distribución, hábitat en el departamento,

así como de sus características fenotípicas, tamaño celular y capsular, crecimiento en rangos de temperatura entre 37 a 42 °C, que son condiciones de virulencia muy importantes. Estos resultados brindan información valiosa para la comprensión y el análisis sobre la epidemiología de la criptococosis en la ciudad de Montería, Córdoba, Colombia.

Presumptive identification of *Cryptococcus gattii* isolated from *Terminalia catappa* in Montería city, Córdoba, Colombia

ABSTRACT

Introduction: the members of the *Cryptococcus neoformans* species complex are responsible for cryptococcosis in animals and humans. Human infection is thought to be acquired by inhalation of airborne propagules from an environmental source; therefore it is greatly important to study their habitat. **Objective:** to determine the ecological relationship of *Cryptococcus gattii* with *Terminalia catappa* trees present in urban areas of Montería city in Colombia. **Methods:** a total of 163 *Terminalia catappa* trees were selected; some samples were taken from the bark, the leaves, the flowers, the fruits of these trees and from the surrounding soil. The yeast was isolated using the *Guizotia abyssinica* seed agar medium; it was identified thanks to biochemical and morphologic tests whereas the right variety was determined by L-canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB), D-proline and D-tryptophan tests. **Results:** there was obtained 9.050 CFU/g isolate of *Cryptococcus* spp., 5.795 CFU/g of which were presumptively identified as *Cryptococcus gattii*. The highest percentage of isolates was found in flowers, followed by bark and fruits, presenting small cellular and capsular sizes. These isolates were more frequent in the south of the city, followed by the center zone and the lowest percentage in the northern zone. **Conclusions:** these findings confirmed the close relationship of *Cryptococcus gattii* and *Terminalia catappa*, being this the first study conducted in Montería city. These results give us meaningful information for understanding and analyzing the epidemiology of cryptococcosis in Montería city, Colombia.

Key words: *Cryptococcus gattii*, *Terminalia catappa*, habitat, propagules, environment.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frases S, Ferrer C, Sánchez M, Colom-Valiente M. Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. *Rev Iberoam Micol.* 2009;26(2):112-7.
2. Pérez C, Martínez W, Reyes H, Torres J, Roselló A, Hartung C, et al. *Cryptococcus* spp. en Venezuela y su relación con el biotipo del MicroScan®. *Rev Soc Venez Microbiol.* 2008;28:61-5.
3. Granados D, Castañeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:636-44.
4. Guevara-Campos J, González-Guevara L, Urbáez-Cano J, Fermín S. Meningoencefalitis por *Cryptococcus neoformans* en escolares inmunocompetentes. *Invest Clin.* 2009;50(2):231-9.
5. Lizarazo J, Linares M, De Bedout C. Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia, 1997-2005. *Biomédica.* 2007;27:94-109.
6. Quintero E, Castañeda E, Ruiz A. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:93-8.
7. Granados D, Castañeda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microbial Ecology.* 2005;49:1-9.
8. Escandón P, Quintero E, Granados D, Huérfano S, Ruiz A, Castañeda E. Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus* spp. en Colombia. *Biomédica.* 2005;25:390-7.
9. Torres-Rodríguez J, Alvarado-Ramírez E, Gutierrez-Gallego R. Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:27-31.
10. Pérez C, Dolande M, Moya M, Roselló A, Hartung de Capriles C, Landaeta M, et al. *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*: Serotypes in Venezuela. *Mycopathology.* 2008;166:149-53.
11. Kidd S, Chow Y, Mak S, Bach P, Chen H, Hingston A, et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the pacific northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:1433-43.
12. Dufait R, Velho R, De Vroey C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-Proline assimilation. *Mykosen.* 1987;30:483.
13. Martínez G, Barrial L, Illnait M, Valdés I, Fernández C, Perurena M, et al. Utilidad de la D-prolina en la diferenciación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*. *Rev Cubana Med Trop.* 2004;56(1):77-9.
14. Mukamurangwa P, Raes-Wuytack C, De Vroey C. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can be separated from var. *neoformans* by its ability to assimilate D-tryptophan. *J Med Vet Mycol.* 1995;33:419-20.
15. Argüero B, Garza D, Flores V, Cervantes R. Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. *Rev Iberoam Micol.* 1999;16:40-2.
16. Callejas A, Ordóñez N, Rodríguez M, Castañeda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C from the environment in Colombia. *Med Mycol.* 1998;36:341-4.
17. Kwon-Chung K, Polacheck I, Bennet J. 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.

Recibido: 29 de septiembre de 2010. Aprobado: 11 de marzo de 2011.
Orfa Inés Contreras Martínez. Facultad de Ciencias Básicas e Ingenierías, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. Correo electrónico: oicontreras@hotmail.com