



Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México

Bertha Argüero Licea, Diana Garza Garza, Victor Flores Urbietta y Roberto Arnulfo Cervantes Olivares

Universidad Nacional Autónoma de México, ENEP, Iztacala, Tlalnepantla, México

Resumen

El hábitat de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* no se conoce plenamente en México, por lo tanto se planteó investigar su relación ecológica con *Eucalyptus camaldulensis* presentes en avenidas de la Ciudad de México. Se seleccionaron un total de 135 árboles del género *Eucalyptus* ubicados en las avenidas Lázaro Cárdenas, Cuitlahuac y Vallejo, de ellos se tomaron muestras por duplicado de suelo con restos vegetales, corteza, hojas y flores. Para el aislamiento se utilizó la técnica descrita por Staib y el medio de *Guizotia abyssinica*, para la identificación se realizaron pruebas morfológicas y fisiológicas y finalmente para la determinación de variedad las pruebas de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) y D-prolina.

Se aislaron 87 cepas con características de *Cryptococcus* spp., de ellas ocho correspondieron a *C. neoformans* var. *gattii*, seis en eucaliptos de la avenida Lázaro Cárdenas, una en la avenida Vallejo y otra en Avenida Cuitlahuac. Estos hallazgos confirman la estrecha relación entre *C. neoformans* var. *gattii* y *E. camaldulensis* siendo hasta el momento (de nuestro conocimiento) la primera descripción de aislamiento de esta variedad de *Cryptococcus* a partir de *E. camaldulensis* en México.

Cryptococcus neoformans var. *gattii*, *Eucalyptus camaldulensis*, Hábitat

Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from samples of *Eucalyptus camaldulensis* in Mexico city

Summary

The habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* is not fully known in Mexico. We investigated the relationship of the yeast with *Eucalyptus camaldulensis* soil in three main Avenues of the city. A total of 135 trees of the species *E. camaldulensis*, were selected. Samples were taken in duplicate from the ground containing vegetable debris, tree cortex, leaves and flowers. Isolation of the yeast was made on *Guizotia abyssinica* media, using Staib technique. The identification was accomplished by biochemical and morphologic tests, and caraterization of the variety was made by bromotimol canavanine-glycine-blue (CGB) and D-proline tests.

Isolation of 87 strains of *Cryptococcus* spp. was acomplished and eight of them were identified as *C. neoformans* var. *gattii*. These findings confirmed the close relationship of *C. neoformans* var. *gattii* and *E. camaldulensis*. To our knowledge this is the first report concerning the isolation of this variety from *E. camaldulensis* trees in Mexico.

Key words

Cryptococcus neoformans var. *gattii*, *Eucalyptus camaldulensis*, Habitat

Dirección para correspondencia:

Dr. Roberto Cervantes Olivares
Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, UNAM,
Dpto. de Microbiología e Inmunología, Laboratorio de
Micología, Ciudad Universitaria 04510 México DF,
México.
Fax: +52 622 5971 / 550 0057;
E-mail: raco@sevidor.unam.mx

Aceptado para publicación el 23 de noviembre de 1998

Dentro del género *Cryptococcus* existen 19 especies conocidas y la única descrita como agente etiológico de criptococosis humana es *C. neoformans*, que es una levadura redonda u ovalada de aproximadamente 3-7 µm de diámetro rodeada de un cápsula polisacárida que varía en tamaño de 1-30 µm, esta se considera responsable de su virulencia y se le atribuyen diversos efectos sobre la respuesta inmune, principalmente inhibición de la fagocitosis y el estímulo en la producción de linfocitos T supresores [1].

C. neoformans incluye dos variedades: *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipos A y D (teleomorfo *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*) y *C. neoformans* var. *gattii*, serotipos B y C (teleomorfo *F. neoformans* var. *bacillispora*) [2]. La primera tiene distribución geográfica mundial y la segunda se considera restringida a regiones con clima tropical o subtropical [3], además presentan diferencias antigénicas, ecológicas, epidemiológicas, genéticas y bioquímicas [4-6].

Una de las diferencias importantes entre las dos variedades es el hábitat natural, la variedad *neoformans* tiene como principal fuente ambiental el excremento de palomas y otras aves, aunque se ha aislado de substratos como: frutas, vegetales, productos lácteos y suelo [7]. Las concentraciones de esta levadura en el excremento de paloma a menudo exceden 10⁶ organismos viables por gramo, su alta concentración en este substrato puede estar relacionado a su habilidad para asimilar xantina, urea, ácido úrico y creatinina, compuestos abundantes en el guano de las aves [8]. En cuanto a la variedad *gattii* el primer aislamiento ambiental se describió en 1990 por Ellis y Pfeiffer en Australia quienes lo encontraron en muestras de corteza, hojas y restos vegetales depositados debajo de la cúpula del *Eucalyptus camaldulensis* en floración, concluyendo que existe una asociación específica entre *C. neoformans* var. *gattii* y *E. camaldulensis* y que la dispersión de las partículas infectantes de *C. neoformans* var. *gattii*, parece ocurrir al final de la primavera concordando con la floración del árbol [3].

Posteriormente, en 1991, los mismo investigadores aislaron e identificaron *C. neoformans* var. *gattii* a partir de *E. camaldulensis* pero en un lugar cercano a Fort Point, en los Estados Unidos de Norteamérica; este es el primer aislamiento ambiental reportado fuera de Australia y apoya la hipótesis de que el hongo ha sido exportado de Australia a otros países probablemente por semillas infectadas o por plantas jóvenes de *Eucalyptus* sp. Observaron que la ocurrencia de infecciones por *C. neoformans* var. *gattii* en pacientes con sida se incrementa si se exponen a partículas aerotransportadas durante el florecimiento de árboles de *E. camaldulensis* [9]. En 1992 consiguieron aislar esta variedad de *Eucalyptus tereticornis*, el cual presenta una distribución global similar a la de *E. camaldulensis*, ambas especies son frecuentemente confundidas y sólo distinguibles por la forma y el tamaño del opérculo. Los aislamientos de la variedad *gattii* de *E. tereticornis* y *E. camaldulensis* han sido caracterizados como serotipos B; el serotipo C no ha sido aislado aún del medio ambiente [10].

En Latinoamérica existen pocas descripciones de aislamientos ambientales de *C. neoformans* var. *gattii*; entre ellos el de Gezuele y cols. [11] en Uruguay a partir de un trozo de panel de colmena deshabitado, el de Lazera y cols. [12] en Brasil a partir del guano de murciélago y el de Argüero y cols. [13] en México a partir de *E. tereticornis* apoyado en los hallazgos de Garza y cols. [14] en cepas aisladas de pacientes con sida donde encontraron una frecuencia de 15% para la variedad *gattii* y 85% para la

variedad *neoformans*, lo que indica que la variedad *gattii* esta ampliamente distribuida en el medio ambiente y es capaz de infectar a individuos severamente inmunocomprometidos. Asimismo en los informes de Cervantes y cols. [15] quienes informan de la prevalencia de esta variedad en pacientes con criptococosis en la ciudad de México. Estos antecedentes permitieron plantear el objetivo de este trabajo que fue el demostrar la asociación biotrófica entre *C. neoformans* var. *gattii* y el *E. camaldulensis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio y toma de muestras. La población de estudio consistió en la selección de 135 árboles adultos del género *Eucalyptus* distribuidos en tres avenidas de la Ciudad de México ubicadas al poniente de la Delegación Gustavo A. Madero: avenida Lázaro Cárdenas, avenida Vallejo y avenida Cuicuilahuac.

Para identificar las especies de eucaliptos localizados dentro del área de estudio uno de los duplicados de las muestras de hojas y flores se preparó mediante el método botánico tradicional de prensado y secado [16]. Para la identificación taxonómica del material botánico colectado se tomaron como base las claves existentes [17-19], para la revisión y verificación de especies se compararon con los especímenes existentes en el herbario de la ENEP Iztacala y en Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) con asesoría de investigadores de dichas instituciones.

Las muestras de corteza se tomaron a 1,5 m de distancia a partir del suelo con la ayuda de un cuchillo de campo, las muestras de hojas y flores se colectaron manualmente mediante tijeras para podar. El suelo con restos vegetales se obtuvo de la capa superior y por debajo de la copa de los árboles mediante cucharas de té.

Todas las muestras se tomaron por duplicado, se colocaron en bolsas de polietileno del n° 5 debidamente marcadas y se transportaron al laboratorio en cajas de cartón.

Procesamiento de las muestras. Las muestras se trataron individualmente, previo lavado con agua destilada estéril, con excepción de las del suelo con restos vegetales. De cada muestra 5 g se maceraron en 20 ml de agua destilada estéril y se dejaron reposar de 10 a 15 min, posteriormente se tomaron 0,5 ml de la suspensión resultante y se sembraron en medio simplificado de *G. abyssinica*, se incubaron a 26 °C por siete días y paralelamente se sembró una cepa testigo de *C. neoformans* en el mismo medio. Los cultivos se examinaron diariamente para la búsqueda de colonias de color café oscuro tipo levaduriforme.

De las colonias sospechosas se hicieron preparaciones con tinta china, para observar la morfología microscópica y la presencia de cápsula. Posteriormente se sembraron por estría cruzada en placa con medio de cultivo agar glucosado de Sabouraud (SDA) y se clonaron hasta obtener colonias típicas y puras de levadura.

A partir de la colonia aislada se resembraron en tubos con medios inclinado de SDA y se identificaron hasta especie por morfología microscópica mediante el crecimiento a 37 °C, y las pruebas bioquímicas de producción de ureasa, producción de pigmento café en agar semilla de niger (*G. abyssinica*) y se procesaron en el sistema API 20C (BioMérieux, Francia) para observar los perfiles de asimilación y fermentación de azúcares.

Con el fin de lograr la determinación de la variedad se empleó el método descrito utilizando el agar canavani-

na-glicina-azul de bromotimol (CGB) y la prueba de asimilación de D- prolina [20,21]

RESULTADOS

De 135 árboles del género *Eucalyptus*, 85 se identificaron como *E. camaldulensis*, 29 se encuentran en la avenida Lázaro Cárdenas, 21 en la avenida Cuitlahuac y 35 en la avenida Vallejo, de estos árboles se colectaron un total de 340 muestras de las que fueron aisladas y caracterizadas un total de 87 cepas de *Cryptococcus* spp., de las que sólo ocho correspondieron a *C. neoformans* var. *gattii*, de estos ocho aislamientos de la variedad *gattii*, seis de ellos se encontraron en los árboles de la avenida Lázaro Cárdenas, uno aislado de la corteza, dos de las flores y tres de las hojas, de la Calzada Vallejo se obtuvo una cepa de la muestra de suelo con restos vegetales, mientras que de la Avenida Cuitlahuac se obtuvo un aislamiento de la corteza de un eucalipto (Tabla 1).

Tabla 1. Localización geográfica y origen biológico de las muestras donde se efectuaron los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.

Sustrato	Av. Lázaro Cárdenas		Av. Cuitlahuac		Av. Vallejo	
	Nº de muestras	Nº de cepas	Nº de muestras	Nº de cepas	Nº de muestras	Nº de cepas
Suelo con restos vegetales	29	0	21	0	35	1
Corteza	29	1	21	1	35	0
Hojas	29	3	21	0	35	0
Flores	29	2	21	0	35	0
Total	116	6	84	1	140	1

DISCUSIÓN

Las avenidas que se seleccionaron para este estudio son vías de comunicación con un alto grado de tránsito vehicular. Dentro de la zona urbana de la ciudad de México DF donde los eucaliptos están ampliamente distribuidos. La publicación de los australianos Ellis y Pfeiffer [3] en 1990 provocó el interés de algunos investigadores latinoamericanos [11-14] de aislar *C. neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de eucaliptos e inclusive de otros sustratos naturales.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la existencia de *C. neoformans* var. *gattii* en el medio ambiente de la Ciudad de México DF lo que apoya los informes de Cervantes y cols. [15], Garza y cols. [14] y Castañon-Olivares y cols. [22] quienes informan de la presencia de esta variedad en pacientes con criptococcosis en la ciudad de México. El hecho de encontrar la variedad *gattii* en muestras de *E. camaldulensis* confirma los informes de que el hábitat está íntimamente ligado a estos árboles; un artículo anterior publicado por Argüero y cols. [13] en 1996 demostró la misma relación con *E. tereticornis* muestreados en dos localidades del área metropolitana.

Los resultados de Argüero y cols. en 1996 [13] y los presentados en este trabajo apoyan la hipótesis de Ellis y Pfeiffer [3] sobre la posible exportación de Australia de la var. *gattii* a través de semillas y/o plantas jóvenes de eucaliptos a diversos países del mundo entre ellos México. Teorizamos que la levadura tiene una asociación con los eucaliptos en general y no es específica de especie por lo que probablemente otras fuentes naturales alberguen la levadura como lo han demostrado Gezuele y cols. [11] y Lazera y cols. [12]

Respecto a los tipos de muestras y la metodología utilizada, el suelo con restos vegetales presentó un alto grado de contaminación con hongos filamentosos y levaduras lo cual dificultó el aislamiento de la levadura de interés en este trabajo, en cambio las muestras de flores, hojas y corteza evidenciaron menor contaminación probablemente debido al lavado previo con agua destilada estéril; al corto tiempo de exposición de las flores al medio ambiente o a la presencia de sustancias selectivas como taninos y lignina en la corteza de los árboles. Se confirmó que la técnica descrita por Staib [23] para el aislamiento de *Cryptococcus* spp. es una de las mejores herramientas para este tipo de estudios. El uso de las pruebas de GCB y D-prolina sigue siendo la mejor opción para caracterizar las variedades de este hongo. Con este informe se logra complementar los estudios sobre la epidemiología de la criptococcosis en la Ciudad de México, pero aún es indispensable estudiar lo que sucede en las diferentes regiones de nuestro país.

Bibliografía

- Rippon JW. Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. (3rd Ed) Philadelphia, WB Saunders, 1988.
- Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia* 1976; 68: 942-946.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1642-1644.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* 1990;336: 923-925.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 123-130.
- Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Theodore TS. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* 1978; 167-174.
- Pal M, Mehrotra BS. Studies on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruits and vegetables. *Mykosen* 1984; 28:200-205.
- Ruiz A, Fromtling RA, Bulmer GS. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infect Immun* 1981; 31:560-563.
- Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. *J Infect Dis* 1991; 163:929-930.
- Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:407-408.
- Gezuele E, Calegari L, Sanabria D, Davel Gcivila E. Isolation in Uruguay *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. *Rev Iberoam Micol* 1993; 10:7-9.
- Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the City of Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Vet Mycol* 1993;31:449-454.
- Argüero LB, Garza GD, Torres ZM. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13:27-28.
- Garza GD, Buendía Uribe JL, Martínez Cruz E, Argüero LB. Caracterización de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). *Rev Latinoam Microbiol* 1995;37:273-279.
- Cervantes RA, Segundo C, Salas E. The varieties of *Cryptococcus neoformans* isolated from cases of meningitis in Mexico City: their relation with HIV. In: Program & Abstracts of XII Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Adelaide, South Australia 1994 ISHAM, 1994; Abstract P01.110:D80.
- Lot A, Chiang F. Manual de herbario; Consejo Nacional de la Flora de México A.C. México, 1989: 142.
- Cozzo D. *Eucalyptus* y *Eucalyptotecnica*. Buenos Aires, Librería El Ateneo, 1955: 393.
- Bailey LH. Manual of cultivated plants. New York, Mac Millan, 1977.
- Blakely WK. A key to the *Eucalyptus*. Forestry and timber Burear (3ª. Ed) Camberra, Australia, 1965.
- Kwon-Chung KJ, Polachek Y, 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; 15:535-537.
- Dufait R, Velho R, De Vroey C. Rapid identification on the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen* 1987;30:483.
- Castañon-Olivares LR, López R, Barriga Angulo G, et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in AIDS patient: first observation in Mexico. *J Med Vet Mycol* 1997;35:57-59.
- Staib F, Seibold M, L'Age M, et al. The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections of AIDS patients. *Zentralbl Bakteriol Hyg* 1987;266:167-177.