



# Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de Alicante

M<sup>a</sup> Francisca Colom Valiente, Mercedes Alberdi, Inmaculada Meseguer, Josep M<sup>a</sup> Torres-Rodriguez \*

Dpto. Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Campus San Juan, 03080 Alicante y \*Laboratori de Microbiologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona

## Resumen

Realizamos un estudio de presencia de la levadura *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de las ciudades de Alicante y Santa Pola. La búsqueda se realizó en heces de palomas urbanas y palomas en cautiverio, así como en estructuras vegetales de *Eucalyptus camaldulensis*. El estudio muestra una elevada prevalencia de levaduras de este género muy superior en heces de paloma en cautiverio (81,5%) que en las de palomas urbanas (16,3%). Se estudiaron los biotipos y variedades correspondiendo un 79,3% de los aislamientos a *C. neoformans* pertenecientes todos ellos a la variedad *C. neoformans* var. *neoformans*. No se detectó la presencia de esta especie en estructuras vegetales de *E. camaldulensis* aunque si aislamos *Cryptococcus laurentii* en algunas muestras de flores.

## Palabras clave

*Cryptococcus neoformans*, Ecología, Epidemiología, Biotipificación

## Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples in Alicante

## Summary

A study of the incidence of *Cryptococcus neoformans* in Alicante was carried out in environmental samples from the cities of Alicante and Santa Pola. The samples were pigeons faeces and *Eucalyptus camaldulensis* tissues. This study shows that the prevalence of the yeast in faeces from captive pigeons is higher (81,5%) than in the same samples from urban pigeons (16,3%). Regarding the biotype and varieties, a 79,3% of the isolates belonged to *C. neoformans*, and all of them were *C. neoformans* var. *neoformans*. None of the *E. camaldulensis* samples showed *C. neoformans* growth, although some *Cryptococcus laurentii* strains were isolated from flowers.

## Key words

*Cryptococcus neoformans*, Ecology, Epidemiology, Biotyping

*Cryptococcus neoformans* es una levadura encapsulada de la que se han descrito dos variedades definidas en base a su resistencia o sensibilidad a compuestos como la L-canavanina y a su capacidad para asimilar o no aminoácidos como la prolina [1].

Esta levadura posee una peculiar distribución geográfica de sus variedades y serotipos, habiéndose encontrado una incidencia muy elevada de *C. neoformans* var. *neoformans* tanto en Europa como en el norte de América, mientras que en zonas tropicales o subtropicales, la variedad *C. neoformans* var. *gattii* es la que predomina [2]. Esta peculiar distribución geográfica hace importante el estudio de su hábitat natural, como posible fuente de contagio para individuos susceptibles [3]. Se sabe desde hace mucho tiempo que *C. neoformans* var. *neoformans* se encuentra en la naturaleza en las excretas desecadas de las aves, fundamentalmente las de paloma urbana (*Columba livia*). En cuanto a *C. neoformans* var. *gattii* su hábitat natural ha permanecido incierto hasta hace pocos años, en que se aislaron numerosas cepas de

esta variedad a partir de tejidos vegetales de *Eucalyptus camaldulensis*. A su vez se pudo correlacionar la distribución geográfica de dicho árbol con la incidencia de esta levadura en muestras clínicas [4].

En 1994 iniciamos un estudio de presencia de *Cryptococcus neoformans* en medios naturales de nuestra área geográfica. En esta comunicación presentamos los resultados obtenidos del aislamiento, tipificación bioquímica y estudio de variedades de las cepas obtenidas en medios naturales de las ciudades de Alicante y Santa Pola (España).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras estudiadas fueron de tres tipos: heces de palomas urbanas, heces de palomas en cautiverio (palomares) y tejidos vegetales de *Eucalyptus camaldulensis*. En cuanto a las heces de palomas urbanas, elegimos tres zonas de la ciudad de Alicante donde abundan las palomas y por lo tanto, donde se acumulan heces de las mismas en el suelo y otras superficies. En cuanto a las heces de palomas en cautiverio, se obtuvieron de instalaciones de la Sociedad de Colombicultores de Santa Pola, y jaulas de palomas mensajeras de un colombicultor particular de Alicante. Por otra parte, seleccionamos algunos de los eucaliptos presentes en la ciudad e identificados como pertenecientes a la especie *E. camaldulensis* [5], en

## Dirección para correspondencia:

Dra. M.F. Colom-Valiente  
Dpto. Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Campus San Juan, 03080 Alicante, España. Fax: (+34 6) 565 8717, E-mail: Colom@ua.es

Aceptado para publicación el 22 de octubre de 1996

los que se tomaron muestras de corteza, hojas, flores y frutos.

Las muestras vegetales se fragmentaron y trituraron y, de igual modo que las heces, se separaron en dos porciones. Una de ellas se resuspendió en solución salina fisiológica (1:1 p/v) y tras agitación se sembró 0,1 ml de las suspensiones en la superficie de dos medios de cultivo: agar de Sabouraud con cloranfenicol y agar *Guizotia abyssinica*-creatinina. La otra porción se inoculó directamente extendiendo la muestra en la superficie de los mismos medios de cultivo. La incubación se realizó a 30°C durante 48-72 horas. Las colonias sospechosas se estudiaron observando en primer lugar, su morfología microscópica utilizando las tinciones de azul de lactofenol y tinta china. Se aislaron todas las cepas que presentaron características morfológicas compatibles con *C. neoformans* sometiéndolas posteriormente a las siguientes pruebas de identificación y biotipificación: prueba de la ureasa, producción de pigmento en agar semillas, crecimiento a 37°C y el estudio de asimilación de azúcares mediante el sistema comercial Auxacolor (Diagnostics Pasteur, Francia) que además incluye el test de resistencia a actidiona y producción de fenoloxidasas.

Con los resultados obtenidos se adjudicó a cada cepa un biotipo representado por un código correspondiente al sistema comercial. Este estudio permitió además confirmar la identificación de las cepas, ya que únicamente algunos códigos corresponden a *C. neoformans*.

Por último, los aislamientos identificados como *C. neoformans* se sembraron en medio con L-canavanina para estudio de variedades.

## RESULTADOS

Aislamos un total de 92 cepas pertenecientes al género *Cryptococcus* correspondiendo un 79,3% de ellas a *C. neoformans* (73 aislamientos). El perfil bioquímico (biotipo) obtenido con cada una de ellas se representa mediante el sistema de códigos ofrecido por crecimiento en galerías Auxacolor (Tabla). El biotipo más frecuente fue el correspondiente al código 75775, en el que el estudio de asimilación de azúcares únicamente es negativo para la lactosa.

En cuanto al estudio de variedades, todos los aislamientos de la especie *C. neoformans* correspondieron a la

**Tabla.** Aislamiento de levaduras del género *Cryptococcus* procedentes de muestras de medio ambiente de Alicante.

Tipo de muestra	Nº aislamientos	Especie	nº	Biotipo	nº	
Heces de paloma en zonas urbanas	15	<i>C. albidus</i>	2	75775	1	
		<i>C. laurentii</i>	12			
		<i>C. neoformans</i>	1			
Heces de paloma en jaulas	75	<i>Cryptococcus</i> sp.	2	75775	45	
		<i>C. laurentii</i>	1			
		<i>C. neoformans</i>	72			
			75774			20
			75765			1
			75574			2
	75764	2				
	75575	1				
	71775	1				
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> (flores)	2	<i>C. laurentii</i>	2			
TOTAL	92		92		73	

variedad *C. neoformans* var. *neoformans*.

La distribución de las cepas en los distintos sustratos y puntos de muestreo mostró un elevado número de aislamientos en heces de palomas en cautiverio (75/92), siendo muy bajo para las muestras de heces de zonas urbanas (15/92). Probablemente esto se deba a las condiciones ambientales a las que se ven sometidas, fundamentalmente el grado de humedad y la incidencia directa de radiación solar en zonas urbanas. La recuperación de la levadura a partir de estructuras vegetales de *E. camaldulensis* fue muy escasa, ofreciendo únicamente dos cepas de la especie *C. laurentii*.

Por último, no se encontraron diferencias significativas en la recuperación de la levadura entre las muestras resuspendidas en solución salina fisiológica y las sembradas directamente sobre el medio de cultivo.

*El presente trabajo ha sido subvencionado en su totalidad por la Fundación Navarro-Tripodi de Alicante. Por otra parte, queremos agradecer a la Sociedad de Colmbicultores de Santa Pola y a D. Tomás Cortés, colmbicultor y propietario de un importante grupo de palomas mensajeras, su desinteresada colaboración, sin la cual no hubiera sido posible llevar a cabo el estudio.*

## Bibliografía

- Kwong-Chung KJ, Polacheck 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: 535-537.
- Kwong-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol. 1984; 120: 123-130.
- Staib F. Cryptococcosis in AIDS- Mycological diagnostic and epidemiological observations. AIFO. 1987; 2: 363-382.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1642-1644.
- Galan-Bano F. Árboles de las calles, plazas, parques y jardines de la ciudad de Alicante. Alicante, Caja de Ahorros del Mediterráneo, 1991.