

Primer aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Argentina

G. DAVEL*, R. ABRANTES, M. BRUDNY, S. CÓRDOBA, L. RODERO, C.E. CANTEROS, D. PERROTTA

Departamento Micología INEI ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. Tel/Fax: +54-11-4302-5066. E-mail: gdavel@anlis.gov.ar

RESUMEN

Dos cepas de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B, fueron aisladas en el Parque de los Patricios de la ciudad de Buenos Aires, Argentina. Las muestras se recogieron en primavera, mediante el hisopado de la superficie interior de huecos y grietas de *Eucalyptus* spp. y otros árboles que, lamentablemente, no fueron identificados en el momento de la recolección. Los hisopos se inocularon en placas de agar ácido cafeico suplementado con antibióticos que se incubaron a 28 °C durante una semana con observación diaria. Los aislamientos produjeron colonias características de la especie, lo que permitió detectarlos y separarlos de otros microorganismos presentes en la muestra. La identificación se realizó mediante estudios de fermentación de carbohidratos, asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno y detección de ureasa y fenoloxidasa. La variedad se determinó utilizando el medio agarizado de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). La caracterización genotípica por reacción en cadena de la polimerasa con *primer* aleatorio (AP-PCR con el *primer* (GACA)₄) mostró que el patrón de bandas de ambos aislamientos se diferenciaba en una única banda. En ambos casos el material provino de especies arbóreas diferentes de *Eucalyptus* spp. Estos dos aislamientos de fuentes naturales demuestran que *C. neoformans* var. *gattii* está presente en el medio ambiente de la ciudad de Buenos Aires, no necesariamente asociado a *Eucalyptus* spp. Este hallazgo podría explicar su asociación esporádica a infecciones humanas en la población local.

Palabras claves: *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, aislamientos ambientales, Argentina

SUMMARY

First environmental detection of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Argentina. Two strains of *C. neoformans* var. *gattii* serotype B were isolated from a park in Buenos Aires city, Argentina. Samples were collected in spring, rubbing with swabs on the inner hollow of *Eucalyptus* spp. and other trees, which were not identified at the collection moment. Samples were swabbed directly onto cafeic acid with antibiotic agar, then incubated at 28 °C and observed daily for a week. Isolates were recovered from cafeic acid medium showing characteristic colonies of the species that allowed differentiation from other microorganisms of the sample. Identification was performed using carbohydrate fermentation, assimilation of nitrogen and carbon sources, and urease and phenoloxidase detection. Strain variety was determined with canavanine-glicine- bromotimol blue agar medium (CGB). Genotypic characterization using AP-PCR with (GACA)₄ aleatory primer showed that both band profiles could be differentiated by only one band. These two strains were isolated from tree species different from *Eucalyptus* spp. These isolates from natural sources demonstrate that *C. neoformans* var. *gattii* exists in Buenos Aires city environment and that it is not necessarily associated with *Eucalyptus* spp. The presence of *C. neoformans* var. *gattii* in the environment, detected for the first time in Argentina, may explain its sporadic association with human infections in the local population.

Key words: *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, environmental isolates, Argentina

Cryptococcus neoformans incluye 2 variedades y 5 serotipos, *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D y AD) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C) (11, 18). A raíz de la aplicación de técnicas de biología molecular al estudio de las variedades, se propuso en 1999 la separación de la variedad *neoformans* en dos variedades, *grubii* para el serotipo A y *neoformans* para el serotipo D (5).

La distribución geográfica de *C. neoformans* var. *neoformans* es mundial, y su nicho ecológico se encuentra en el intestino y excrementos de palomas (*Columba livia*) y otras aves. Hasta hace pocos años se consideró que la distribución de la variedad *gattii*, en cambio, estaba restringida a unas pocas zonas de Australia, sur de California, Italia, Méjico, Brasil, Africa central y el sudeste asiático, y la única fuente ambiental conocida de esta variedad se encontraba asociada a *Eucalyptus camal-dulensis* y otras especies del género. En 1993 se recuperó de un nido abandonado de camoatíes (*Polybia accidentalis*) en Uruguay, y en 1999 de

fuentes naturales en Australia, asociado a *Angophora cosrata*, en Colombia asociado a almendros, en el noroeste de Brasil asociado a *Guettarda acreana*, *Moquilea tomentosa* y otros árboles de la selva amazónica y en San Pablo asociado a *Eucalyptus* spp. (2-4, 6, 7, 10, 11, 13-15, 17-20).

Hasta la fecha en Argentina no se había recuperado la variedad *gattii* del medio ambiente aunque se han notificado 4 casos de criptococosis causados por esta variedad (1) y otros dos aislamientos clínicos fueron identificados en nuestro laboratorio como variedad *gattii* sero-tipo B.

Es nuestro interés comunicar la recuperación de *C. neoformans* var. *gattii* de fuentes naturales en Argentina. Este es el primer aislamiento ambiental de esta variedad realizado en nuestro país.

Se estudiaron 2 parques de la ciudad de Buenos Aires (Parque de los Patricios y Parque Nicolás Avellaneda) y dos plazoletas circundantes a los edificios de las Facultades de Ciencias Veterinarias y de Agronomía de la ciudad de La Plata. Se recogieron 40, 40, y 20 muestras, respectivamente. Las muestras se colectaron en primavera de 2001, mediante el hisopado de la superficie interior de huecos y grietas de *Eucalyptus* spp. y otros árboles tales como *Jacaranda mimosifolia* y *Tipuana tipu* que, lamentablemente, no fueron identificados en el momento de la recolección. Antes de la recolección de cada muestra el hisopo se humedeció con agua destilada estéril.

Las 100 muestras obtenidas fueron inoculadas en agar ácido cafeico suplementado (11) con antibióticos dentro de las 2 h de colectadas y se incubaron a 28 °C durante una semana con observación diaria. Las colonias marrones que desarrollaron en el medio descrito fueron aisladas tan rápidamente como aparecieron y transferidas a placas de agar glucosado de Sabouraud. La micromorfología de las colonias se observó mediante preparados en fresco con tinta china (11).

La identificación de los aislamientos se realizó mediante estudios de fermentación de carbohidratos, asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno y detección de ureasa y fenoloxidasas. La variedad se determinó utilizando el medio agarizado de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (9, 11, 12).

El serotipo fue establecido mediante aglutinación en lámina frente a antisueros específicos. Los antisueros fueron producidos en nuestro laboratorio mediante la inmunización de conejos con células de *C. neoformans* muertas con formalina utilizando el método descrito por Ikeda *et al* (8), modificado por las Dras. Kwon-Chung y Castañeda (comunicación personal). Las cepas usadas fueron ATCC 62067 (serotipo A), NIH 112B (serotipo B) y NIH 52D (serotipo D), y UCLA 381-C (serotipo C).

La caracterización genotípica se realizó por reacción en cadena de la polimerasa con *primer* aleatorio (AP-PCR con el *primer* (GACA)₄) (16), los patrones de bandas generados por PCR se analizaron visualmente y utilizando el programa 1D Image Analysis Software v 2.0.3 (Kodak Digital Science).

En dos de las 100 muestras procesadas se recuperó *C. neoformans* var. *gattii*, en el medio de ácido cafeico, donde produjeron colonias características de la especie, lo que permitió detectarlos y separarlos de otros microorganismos presentes en la muestra. En ambos casos el material provino de especies arbóreas diferentes de *Eucalyptus* spp. recolectados en el Parque de los Patricios de la ciudad de Buenos Aires.

Los dos aislamientos crecieron y viraron el color del medio de CGB. La variedad fue confirmada por el Dr. W. Meyer del Hospital Westmead, Australia. La serotipificación con antisueros específicos determinó que correspondían al serotipo B y el patrón de bandas obtenido por AP-PCR mostró que ambos aislamientos eran genotípicamente similares, diferenciándose en una única banda (Figura 1).

Estos son los dos primeros aislamientos ambientales de *C. neoformans* var. *gattii* en Argentina comunicados en la literatura.

En nuestro país sólo se han notificado 4 casos de criptococosis causados por esta variedad. Estas cepas y otros dos aislamientos clínicos enviados a nuestro laboratorio fueron serotipo B. La presencia de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo B en el medio ambiente, podría explicar su asociación esporádica a infecciones humanas en la población local. Sin embargo, la asociación de este serotipo a casos clínicos en nuestro país es rara, no se han detectado casos en la ciudad de Buenos Aires aunque el parque donde se obtuvo el aislamiento es muy transitado y se encuentra ubicado en las proximidades de dos hospitales donde se atiende población infectada con el virus de la inmunodeficiencia humana. Este hecho sólo podría relacionarse a una baja virulencia de este serotipo.

En el cono sur se había recuperado este serotipo de muestras ambientales en Uruguay y Brasil. En Uruguay se aisló a partir de los restos de un nido de la avispa *Polybia occidentalis* mezclado con hojas y suelo (6). En Brasil fue aislado de guano de murciélagos en un ático abandonado de una vieja casa de la ciudad de Río de Janeiro, en un hueco del tronco de *Moquilea tomentosa* en la ciudad de Teresina en el noroeste de Brasil y en muestras de madera y detritus de *Eucalyptus* sp. en un parque de la ciudad de San Pablo (13-15).

Probablemente no fue recuperado antes en nuestro país porque en los muestreos ambientales se colectaba excreta de aves o, probablemente, trozos de madera y restos vegetales preferentemente de *Eucalyptus* spp. Nosotros también esperábamos recuperarlo de huecos y grietas de *Eucalyptus* spp., por ese motivo sólo identificamos las muestras que recogimos de estos árboles, sin embargo los dos aislamientos se recuperaron de otras especies arbóreas.

Nuestros resultados indican que este serotipo está presente en el medio ambiente no necesariamente asociado a *Eucalyptus* spp., lo que coincide con los hallazgos de otros investigadores (6, 14). Quizá este serotipo no sólo está asociado a *Eucalyptus* spp. sino también a otros árboles autóctonos de América o naturalizados y es, por lo tanto, necesario realizar muestreos adicionales en Buenos Aires y otras regiones del país para determinar su distribución y su probable nicho ecológico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bava AJ, Negroni R (1992) The epidemiological characteristics of 105 cases of cryptococcosis diagnosed in the Republic of Argentina between 1981-1990. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 34: 335-340.
2. Callejas A, Ordoñez N, Rodríguez MC, Castañeda E (1998) First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med. Mycol.* 36: 341-344.
3. Chakrabarti A, Jatana M, Humar P, Chantha L, Kaushal A, Padhye AA (1997) Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3340-3342.
4. Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B (2001) First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 44: 137-140.
5. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A (1999) *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* sero-type A isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37: 838-840.
6. Gezuele E, Calegari L, Sanabria D, Davel G, Sibila E (1993) Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from nest of the wasp *Polybia occidentalis*. *Rev. Iberoam. Micol.* 10: 5-6.
7. Halliday CL, Bui T, Krockenberger M, Malik R, Ellis DH, Carter DA (1999) Presence of alpha and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2920-2926.
8. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L (1982) Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 16: 22-29.
9. Kurtzman CP, Fell JW (1998) *The Yeast, a taxonomic study*. 4th Ed. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam.
10. Kwon-Chung KJ, Bennet JE (1984) Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 120: 123-130.
11. Kwon-Chung KJ, Bennet JE (1992) *Cryptococcosis*. En: Kwon-Chung KJ, Bennet JE (Ed), *Medical Mycology*, Lea & Febiger, Filadelfia, p. 397-446.
12. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE (1982) 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.* 15: 535-537.
13. Lazera MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B (1998) *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*-evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med. Mycol.* 36: 119-122.
14. Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B (2000) Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 38: 379-383.
15. Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM (1993) Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Med. Mycol.* 31: 449-454.
16. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Pereira Igreja R, Hardke C, Methling K, et al (1999) Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA -a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 20: 1790-1799.
17. Pfeiffer T, Ellis D (1991) Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from California. *J. Inf. Dis.* 163: 929-930.
18. Rippon JW (1990) *Cryptococcosis*. En: Rippon JW (Ed), *Tratado de micología médica*, 3ª edición, Interamericana McGraw-Hill, Méjico D.F., p. 629-659.
19. Sorrell TC, Brownlee AG, Ruma P, Malik R, Pfeiffer TJ, Ellis DH (1996) Natural environmental sources of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1261-1263.
20. Swinne D (1984) Study of *Cryptococcus neoformans* varieties. *Mykosen* 27: 137-141.

Figura 1. AP-PCR con el primer aleatorio (GACA)_n. **A)** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, a la derecha **(B)** se muestra el análisis realizado con el programa 1D Image Analysis Software v 2.0.3 (Kodak Digital Science), las flechas indican la banda que diferencia a los aislamientos.

Recibido: 2/10/02 – Revisado: 6/11/02