

Ecología de *Cryptococcus neoformans* en Colombia

Elizabeth Castañeda, Ph.D. Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C.-Colombia

La criptococosis es una micosis sistémica oportunista ocasionada por la levadura basidiomicetácea *Cryptococcus neoformans*, en sus tres variedades *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D, *C. neoformans* var. *gattii* serotipos B y C y, adicionalmente, por el híbrido serotipo AD.

Es consenso general que la infección se adquiere por la inhalación de los propágulos infectantes que se encuentran en el medio ambiente y cuyo pequeño tamaño (< de 5 μm) les permite alcanzar los alvéolos pulmonares. Es discutido si la partícula infectante corresponde a las blastoconidias (5-8 μm) o a las basidiosporas (< 3 μm) producto de la reproducción sexual.

Se acepta que la determinación del hábitat de un agente infeccioso es fundamental en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad por él producida; por lo tanto, desde hace varios años, el Grupo de Microbiología del INS ha venido incursionando en el estudio del hábitat del hongo y, recientemente, el empleo de algunas técnicas moleculares nos está permitiendo acercarnos más a nuestro propósito.

El aislamiento de *C. neoformans* (reconocido hoy como serotipo D) realizado en 1895 por Sanfelice a partir de jugos de frutas, se constituyó en el primero obtenido de una fuente ambiental. Sin embargo, la verdadera historia de los estudios ecológicos de *C. neoformans* se inicia con el informe de Emmons en 1950, sobre la recuperación de la levadura a partir de muestras de suelo contaminadas con excrementos de palomas. Este hallazgo estableció el hábitat de lo que hoy conocemos como *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A. En 1980, el Grupo de Microbiología del INS incursionó en este campo y reprodujo el hallazgo de Emmons, como lo han hecho numerosos autores en el mundo. Fue así como de un total de 75 muestras recogidas en palomares de Bogotá, se recuperó la var. *grubii*, serotipo A de 69% de las muestras. Adicionalmente, en este trabajo se estudió una población con alta exposición a excrementos de palomas y un grupo control de personas no expuestas para determinar si existían en ellos anticuerpos contra el hongo, estudio que no reveló diferencias entre ellos.

Con respecto a la var. *gattii*, su hábitat era desconocido hasta 1990, año en que el grupo australiano de Ellis y Pfeiffer, señalaron cómo los detritos de *Eucalyptus camaldulensis* eran reservorios de tal variedad. Este hallazgo fue de gran significado ya que explicaba la fuente natural de infección de la variedad que ocasionaba el mayor número de casos clínicos en Australia. En posteriores investigaciones el grupo de investigación brasileiro de Marcia Lazera postuló que los árboles podrían constituir el nicho ecológico de dos de las variedades.

Entonces en 1994, decidimos realizar un estudio tendiente a desarrollar la metodología adecuada al procesamiento de muestras vegetales e identificar las especies de *Cryptococcus* asociadas con ellas. Fue así como se estudiaron 21 eucaliptos (100 muestras) ubicados en 5 zonas diferentes de

Bogotá recuperando 27 aislamientos de *Cryptococcus* pertenecientes a 9 especies, 2 de ellos *C. neoformans* var. *grubii*. Posteriormente, se diseñó un estudio con el fin de establecer la posible asociación de varios árboles de este género con especies de *Cryptococcus*. Se recolectaron, mensualmente durante 2 años, 426 muestras de madera de 19 *Eucalyptus*. Éstas se procesaron por los procedimientos estandarizados previamente. Fue posible recuperar 17 aislamientos de especies de *Cryptococcus*: 14 *C. laurentii*, 2 *C. neoformans* var. *neoformans* y 1 *C. albidus*. Si bien se estableció la asociación del hongo con los eucaliptos, no se logró recuperar la variedad *gattii* de ninguna de las especies del género *Eucalyptus* ubicadas en el parque.

La información clínica disponible en el laboratorio señalaba que, en Cúcuta, Norte de Santander, 78% de los casos de criptococosis en pacientes sin sida, eran ocasionados por la var. *gattii*. Por tal motivo, se inició un estudio sistemático sobre el hábitat de la var. *gattii* en esta ciudad. La muestra, seleccionada por tamaño y sitio, consistió en detritos de un cierto número y varias clases de árboles (*Eucalyptus*, *Cassia*, *Moquilia*), así como de otros árboles nativos de la región. Durante 11 meses consecutivos se recolectaron muestras alrededor de las casas de siete pacientes con infección por la var. *gattii*, residentes en el área urbana y de cinco sitios en las afueras de la ciudad. De las 1.736 muestras procesadas se aislaron 186 levaduras del género *Cryptococcus*, 40 de las cuales correspondieron a *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, 121 a *C. laurentii* y 25 a *C. albidus*. Debido a que los almendros (*Terminalia catappa*) son comunes en el área, este género se adicionó a los otros árboles ya estudiados. Inicialmente, por un período de 5 meses, se analizaron detritos, material vegetal y muestras de aire. Del detrito de 68 almendros, fue posible aislar *C. neoformans* var. *gattii*, serotipo C. Fue éste el primer informe en la literatura sobre el aislamiento del serotipo C a partir del ambiente. Este hallazgo fue confirmado posteriormente tanto en los almendros de Cúcuta como en Cundinamarca, Barranquilla y Neiva.

Con el fin de caracterizar los aislamientos ambientales serotipo C, se han empleado una serie de marcadores fenotípicos como son la morfología, el tamaño de colonias, de las levaduras y cápsula, el establecimiento de curvas de crecimiento, la producción de melanina, así como su patogenicidad para ratones BALB/c. Los datos obtenidos señalan algunas especificidades, especialmente las relacionadas con su baja virulencia en el modelo en ratones.

El informe del aislamiento de *C. neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendros (*T. catappa*), motivó la realización de un estudio *in vitro* encaminado a evaluar la supervivencia de *C. neoformans* en plántulas de almendros. Con tal fin y en una experiencia preliminar, se infectaron en el tallo 30 plántulas. El material vegetal fue procesado con diferentes técnicas y en diferentes periodos post-infección. No se observó alteración macroscópica ni microscópica en las plántulas infectadas. Sin embargo, *C. neoformans* permaneció viable hasta 100 días después de la infección, lo que fue establecido con la técnica de recuperación de hongos endofitos.

Es importante anotar que para la var. *gattii*, serotipo B, que es la segunda variedad recuperada de aislamientos clínicos, no había sido posible determinar su hábitat. En el 2003 en colaboración con la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, iniciamos un proyecto cuyo objetivo era establecer el hábitat de las variedades de *Cryptococcus* asociado con detritos

de eucaliptos y de almendros en diferentes pisos térmicos del departamento de Cundinamarca. Paralelamente en tres sitios de Bogotá, se estudió un número definido de diferentes árboles, al igual que el estudio de las condiciones ecológicas de tales lugares. En estos dos estudios fue posible recuperar por primera vez en nuestro medio, *C. neoformans* var. *gattii*, serotipo B, asociado tanto con detritos de eucaliptos como de otros árboles nativos.

Actualmente se están aplicando algunas técnicas de biología molecular en el estudio de los aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* con el fin de establecer sus relaciones genéticas y obtener un conocimiento más preciso de la relación parásito-hospedero. Este sería un paso fundamental en el estudio de la fisiopatología de esta importante micosis oportunista.

Referencias

- Corrales CS, Ordóñez N, Londoño LM, Castañeda E. Determinación de anticuerpos contra *Cryptococcus neoformans* en un grupo de colombófilos. *Biomédica*. 1981; 7:100-104.
- Duarte A, Ordóñez N, Castañeda E. Asociación de levaduras del género *Cryptococcus* con especies de *Eucalyptus* en Santa fe de Bogotá. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 1994; 36: 125-130.
- Ordóñez N, Castañeda E. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. *Biomédica* 1994; 14:131-139.
- Ordóñez N, Chinchilla M, Torrado E, Castañeda E. El despertar del gigante: lo que hemos aprendido sobre la criptococosis y su agente etiológico. Instituto Nacional de Salud, 1917-1987. Una historia, un compromiso. Toro G, Hernández CA, Raad J (eds). Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá 1998: 262-269
- Callejas A, Ordóñez N, Rodríguez MC, Castañeda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Medical Mycology* 1998; 36:341-344.
- Castañeda E. En búsqueda del hábitat de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Colombia. *Rev Acad Colomb Cienc* 2001; XXV: 105-114.
- Castañeda A, Castañeda E. Aislamiento de especies de *Cryptococcus* asociadas con *Eucalyptus* en un parque de Bogotá. *Biomédica* 2001; 21:75-8.
- Castañeda A, Huérfano S, Rodríguez MC, Castañeda E. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendros. *Biomédica* 2001;21:70-4.
- Huérfano S, Castañeda A, Castañeda E. Experimental infection of almond trees seedlings (*Terminalia catappa*) with environmental isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001; 18:131-132.
- Escandón P, Huérfano S, Castañeda E. Inoculación experimental de *Terminalia catappa* con un aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotipo C. *Biomédica* 2002; 22:254-258.
- Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh H, Castañeda E, and the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*, 2003; 9:189-195.
- Huérfano S, Cepero MC, Castañeda E. Caracterización fenotípica de aislamientos ambientales de *Cryptococcus neoformans* *Biomédica* 2003; 23:328-40.

Granados DP, Castañeda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. Aceptado para publicación en *Microbial Ecology*, febrero 2004.