

***Cryptococcus gattii* en fruto de almendro (*Terminalia catappa*) en Montería, Córdoba, Colombia**

***Cryptococcus gattii* in fruit almond (*Terminalia catappa*) in Monteria, Cordoba, Colombia**

Jany L. Alarcón F¹, Orfa I. Contreras M¹, María P. Aycardi M¹.

Recibido: Febrero 6 de 2014 - Aceptado: Mayo 17 de 2014

Resumen

El complejo *Cryptococcus neoformans*, comprende levaduras capsuladas que se reproducen por gemación; tienen un hábitat exógeno, relacionado con excretas de palomas y con árboles de *Eucalyptus* spp, y almendro (*Terminalia catappa*). Estas levaduras son causantes de criptococosis, enfermedad sistémica de curso generalmente sub-agudo o crónico que afecta tanto a humanos como a animales. Los propágulos de estas levaduras presentes en el ambiente, una vez inhaladas, dan lugar a la aparición de focos infecciosos en el parénquima pulmonar a partir del cual se pueden diseminar a otros órganos del cuerpo. El objetivo de este estudio fue establecer la existencia de *Cryptococcus gattii*, en frutos de *T. catappa* presentes en la zona urbana de la ciudad de Montería, Colombia. Para este propósito, se seleccionaron 163 árboles de *T. catappa* de los cuales se tomaron 489 muestras de fruto. El aislamiento se realizó utilizando el medio *Guizotia abyssinica*; la identificación se hizo mediante pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas, y la variedad se determinó con las pruebas de L-canavanina-glicina-azul de bromotimol y crecimiento en medios con D-prolina y D-triptofano. *Cryptococcus* spp. se aisló en un 62% de las muestras, de las cuales el 37,7% correspondió a *C. gattii*. El mayor porcentaje de aislamientos se obtuvo en frutos maduros, lo que mostraron las pruebas paramétricas T de Student y Z según las cuales, existen diferencias significativas de crecimiento de la levadura en los frutos con diferentes estados de madurez, con un valor de significancia de ($p=0,02$) y un intervalo de confianza de la media del 95%.

Palabras clave: *Cryptococcus gattii*, *Terminalia catappa*, propágulos, fruto.

Abstract

The *Cryptococcus neoformans* complex, comprises encapsulated yeasts that reproduce by budding; they have an exogenous habitat, related to pigeon excreta and *Eucalyptus* spp and almond (*Terminalia catappa*) trees, among others. These yeasts are responsible of cryptococcosis, a systemic disease of course generally

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba; Carrera 6 N° 76-103 (CP354), Montería, Colombia.

Correspondencia: E-mail: oicontreras@hotmail.com

sub-acute or chronic that affects both humans and animals. The propagules of these yeasts present in the environment, once inhaled, it gives place to the appearance of infectious foci in the lung parenchyma from which they can spread to other organs. The objective of this study was to establish the existence of *Cryptococcus gattii* in *T. catappa* fruits present in the urban area of Monteria city, Colombia. For this purpose, it was selected 163 *T. catappa* trees from which they were taken 489 samples of fruit. The isolation was performed using *Guizotia abyssinica* agar medium; the identification was done by biochemical, physiological and morphological tests, and the variety was determined with the L-canavanine-glycine- bromothymol blue test and growth on mediums with D-proline and D-tryptophan. *Cryptococcus spp* was isolated in a 62%, of the samples, from which a 37,7% corresponded to *Cryptococcus gattii*. The higher percentage of isolates was obtained in mature fruits, what showed the parametric tests T and Z Student by which, there are significant differences in growth of yeast in the fruits with different states of maturity, with a value of significance ($p=0.02$) and a confidence interval of the media of 95%.

Key words: *Cryptococcus gattii*, *Terminalia catappa*, propagules, fruit.

Introducción

Los miembros del complejo *Cryptococcus neoformans* son levaduras capsuladas, ovals o esféricas, de tamaño variable (4-8 μm). Estas levaduras pueden ocasionar enfermedad tanto a personas inmunocomprometidas como inmunocompetentes. Existen dos especies principales patógenas al hombre: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. *C. neoformans* comprende dos variedades y tres serotipos: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipos A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos D) y un híbrido (serotipo AD). *Cryptococcus gattii* incluye los serotipos B y C [13, 17], de igual forma han sido reportados los híbridos entre *C. neoformans* y *C. gattii* (serotipos BD y AB) [3,4]. La criptococosis causada por estas levaduras, es una enfermedad sistémica de curso generalmente sub-agudo o crónico; la forma primaria es casi siempre pulmonar pero no necesariamente sintomática. En su forma diseminada la entidad tiene marcado tropismo por el sistema nervioso central, aunque ocurren también lesiones mucocutáneas, óseas y de otros órganos profundos [5, 15]. En la actualidad, se aprecia un aumento significativo en la incidencia de criptococosis, la que ocurre paralela con el aumento de infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [5, 7].

La variedad *grubii* y *neoformans* tienen distribución mundial y predilección por suelos contaminados

con excrementos de aves, especialmente de palomas (*Columba livia*) [12], la variedad *gattii* estaba limitada a regiones templadas, tropicales y subtropicales; sin embargo, aislamientos reportados en otros estudios hacen prever la capacidad de adaptación de esta variedad a otras latitudes [11, 22].

La amplia distribución del hongo en la naturaleza, así como el hallazgo anatomopatológico accidental de lesiones residuales pulmonares por miembros de este complejo en personas sanas, permiten afirmar que la exposición al hongo es frecuente.

El hábitat de *C. gattii*, causante de infección en personas inmunocompetentes, ha sido asociado a los árboles de *Terminalia catappa* [6, 8]. Estos árboles tienen una amplia distribución y cobertura en la zona urbana de la ciudad de Montería, además son empleados frecuentemente alrededor de las viviendas, como sombrío y en la fabricación de alimentos para consumo humano y animal. Los frutos de *T. catappa* son carnosos con forma de almendra de unos 6 cm de largo y 5 cm de ancho que al madurar se tornan amarillos y luego rojos. La pulpa de estos frutos es consumida por el hombre, la fauna silvestre y la avifauna. Las semillas también son comestibles y tienen un alto contenido de aceites y taninos. No obstante investigaciones recientes [1] señalan que debido a la composición de nutrientes es posible el aprovechamiento de esta semilla en la

industria, incluyendo la elaboración de alimentos concentrados para alimentación animal. Por otra parte la semilla de *T. catappa* contiene proteínas, grasas y carbohidratos en condiciones adecuadas, para ser consumidas como una alternativa de nutrientes de origen vegetal [14]. En nuestra región tanto la pulpa como la semilla son muy apetecidas en especial por los niños y adultos, quienes la consumen y disfrutan por su agradable sabor agrídulce y la alta disponibilidad de este alimento durante la época de fructificación. Además las características mismas del fruto y la arquitectura del árbol ofrecen condiciones para la alimentación y refugio de pequeños animales. Este fruto es consumido tanto en forma cruda directa como procesada en forma de una gran variedad de dulces.

Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio se propuso establecer la presencia de *C. gattii*, en el fruto de árboles de *T. catappa* en la zona urbana de la ciudad de Montería. Estos resultados se remitirán a los entes de salud pertinentes del Departamento de Córdoba y del país, para orientar a las personas en la aplicación de medidas preventivas en el manejo y uso de estos frutos y en el control de la infección por esta levadura.

Materiales y Métodos

Lugar de muestreo: Las muestras fueron recolectadas en la zona urbana de Montería, capital del departamento de Córdoba. La ciudad está ubicada a 20 m.s.n.m. Su clima es cálido con una temperatura entre los 28°C y 35°C y humedad relativa del 85% con una precipitación pluvial de 1200 a 2500 mm anuales.

Recolección y procesamiento de muestras: Entre los meses de septiembre de 2008 y septiembre de 2009 se recolectaron un total de 489 muestras de fruto en dos estados de maduración (maduros y verdes) a partir de 163 árboles de *T. catappa*. Las muestras fueron recolectadas al azar, manualmente con tijeras podadoras y depositadas en bolsas de polietileno

Nº 3 debidamente rotuladas y transportadas al laboratorio de Genética de la Universidad de Córdoba donde fueron procesadas por separado, frutos verdes y maduros. Previo lavado con agua destilada estéril, la pulpa de los frutos fue macerada en mortero. Una fracción de 5 g de cada muestra fue resuspendida en 25 ml de buffer fosfato salino PBS a pH 7,3 durante 30 minutos y filtrada a través de una gasa estéril. Posteriormente, al filtrado se le adicionaron 50 µl de una solución con 20U de penicilina (GIBCO BRL) y 40U de estreptomycin (GIBCO BRL). De este filtrado se inocularon 100 µl en el medio de agar semillas de niger (*Guizotia abyssinica*) suplementado con bifenil 0,1% (Merck-Schuchardt OHG. Hohenbrunn Germany). El medio se incubó a 28°C durante cinco días, luego se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) [21]. Como controles se sembraron, en el mismo medio y bajo las mismas condiciones, las cepas testigo CMDM-PUJ H 00025 de *C. neoformans* serotipo A y CMDM-PUJ H 00026 de *C. gattii* serotipo B con códigos internos de colección L-117 para *C. neoformans* y L-120 *C. gattii* donadas por el Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.

Identificación de las levaduras: Las colonias aisladas fueron identificadas por microscopía, mediante la técnica de tinta china, empleando un microscopio de luz con objetivos de 40x y 100x. Para la observación de células capsuladas tipo levaduriforme, se tomaron fotografías utilizando un microscopio ZEISS (Axiostar Plus) con una cámara CANON CS550 adaptada. Se observaron colonias típicas color marrón en el medio selectivo *G. abyssinica*. Las colonias obtenidas en este medio fueron resembradas en medio Sabouraud a partir del cual se les realizaron las pruebas de identificación. La termotolerancia fue evaluada a temperaturas entre 37 y 40°C durante 72 h y se evaluó la producción de ureasa [18] en medio líquido (Bacto Urease Broth, Difco, EE.UU). A cada uno de los filtrados se le realizaron 20 mediciones del tamaño celular y capsular, empleando un

micrómetro ocular con resolución de 1 μm y con el objetivo 100X, estas lecturas fueron promediadas. Posteriormente, las muestras fueron evaluadas con el sistema API 20C (BioMérieux, Francia), para observar los perfiles de asimilación y fermentación de azúcares. La variedad se determinó empleando el medio L-canavanina (Sigma-Aldrich, EE.UU) - glicina (Merck KGaA, Damst, Germany) - azul de bromotimol (CGB) (Merck KGaA, Damst, Germany) [16] y evaluando su capacidad de asimilación y utilización de los aminoácidos D-Prolina (Sigma-Aldrich, Japan) y D-Triptofano (Sigma-Aldrich, EE.UU), utilizando discos impregnados en el medio *G. abyssinica* a concentraciones de 10% (0,01mg/ml), 15% (0,015mg/ml), 20% (0,02mg/ml), 25% (0,025mg/ml) y 30% (0,030mg/ml) para cada uno [19, 20].

Análisis estadístico: los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico XLSTAT versión 2010. La diferencia de crecimiento de UFC/g de la levadura se realizó por medio de las pruebas paramétricas T de Student y prueba Z o prueba de hipótesis.

Resultados - Discusión

Terminalia catappa se encuentra distribuido en áreas tropicales y subtropicales de América y es uno de los árboles más difundidos en Colombia, así como en las principales avenidas, centros educativos y parques de la ciudad de Montería.

Las zonas seleccionadas para este estudio en el perímetro urbano de la ciudad, se caracterizaron por poseer gran cobertura de árboles de *T. catappa* altamente frondosos y con frutos en diferentes estados de madurez. Estos árboles por su arquitectura, son utilizados para sombrío y ornamento alrededor de las viviendas y el fruto es considerado un alimento energético. En su estado de madurez es muy apetecido por los niños, adultos y pequeños animales de la región, quienes disfrutan tanto de la pulpa como de la única semilla que posee por su agradable sabor. Su utilización debido a su potencial

nutricional es muy variada, tanto en crudo como en elaborado frito o tostado y su aplicación es diversa en consumo directo, repostería, dulces, mermeladas, turrone entre otros.

De los 163 árboles muestreados, se encontró *Cryptococcus* spp en el 62% de ellos (101 árboles), lo que correspondió a un recuento total de 1418 UFC para las muestras positivas. De estos aislados positivos, el 37.7% correspondió a *C. gattii* (535 UFC en total), mientras que el 62,2% eran otras levaduras como *C. neoformans*, *C. laurentii*, y *C. albidus*. Los aislados de *C. gattii* se obtuvieron principalmente de frutos maduros (66%), y en menor proporción en frutos verdes (34%), esto probablemente por la presencia de azúcares, compuestos polifenólicos, flavonoides, entre otros, los cuales se encuentran en mayor cantidad en el fruto maduro [2], y pueden servir como sustrato para el crecimiento de estas levaduras. Los datos se procesaron utilizando las pruebas paramétricas de T de Student y Z o prueba de hipótesis las cuales nos indicaron, que existen diferencias significativas de crecimiento de la levadura en los frutos con diferentes estados de madurez, con un valor de significancia de ($p=0,02$) y un intervalo de confianza de la media del 95%.

Encontrar *C. gattii* en el fruto de *T. catappa* coincide con estudios previos en nuestra región [9] donde se encontró *C. gattii*, en el 26% de los frutos estudiados y corrobora una vez más que el hábitat de esta levadura está íntimamente relacionada con estos árboles [21]. Estos datos son de gran relevancia, teniendo en cuenta no solo la constante exposición de humanos y animales a estas levaduras, sino también el contacto directo con el fruto durante la manipulación en la preparación y consumo de alimentos.

Los miembros del complejo *C. neoformans* causan enfermedad a individuos tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos por lo que nuestros resultados son de gran valor, si tenemos en cuenta, el aumento significativo

en los últimos años, en el número de personas infectadas con VIH en nuestra región (Guevara A. Departamento Administrativo de Salud de Montería, 2010. Comunicación personal).

Los resultados con la técnica de tinta china, confirmaron la presencia de levaduras capsuladas. Todos los aislamientos tuvieron actividad ureasa positiva y respondieron al perfil bioquímico para esta levadura. La diferenciación de la variedad se determinó por la capacidad de *C. gattii* de crecer y modificar el medio CGB, la resistencia a la L-canavanina se atribuye a la presencia de enzimas que la degradan y la convierten en compuestos no tóxicos [16]. Además esta prueba se confirmó con el crecimiento abundante de *C. gattii* alrededor de discos impregnados con D-prolina y D-triptófano en las diferentes concentraciones evaluadas. Nuestros aislamientos mostraron termotolerancia a temperaturas entre 37 y 40°C durante 72 h, esta es una característica de patogenicidad de estas levaduras lo que coincide con otros estudios [21]. Todas estas pruebas para la identificación de *C. gattii*, fueron comparadas con las muestras de *C. gattii* y *C. neoformans* empleadas como controles obteniendo los mismos resultados.

Se encontraron igualmente células capsuladas, con tamaños celulares de $2,93 \pm 0,55 \mu\text{m}$ y tamaños capsulares de $1,50 \pm 0,38 \mu\text{m}$, para cada extracto evaluado, lo que coincide con otros estudios [10, 21]. Tamaños microscópicos menores de $4 \mu\text{m}$ en estas levaduras se consideran infecciosos. Estos hallazgos, nos permiten sugerir, de igual forma que nuestros aislamientos podrían iniciar ciclos infecciosos.

Los frutos evaluados, no presentaron ningún tipo de alteración anatómica visible, por lo que esta asociación nos permite suponer que *T. catappa* puede actuar como un hospedero intermediario para el hongo lo que coincide con otros estudios [10].

Estos resultados, brindan información valiosa para la comprensión y el análisis de la

epidemiología de la criptococosis en la ciudad de Montería, nos inducen al monitoreo y toma de medidas preventivas en cuanto a la manipulación y consumo de la pulpa y semilla de este fruto. Además, amplían nuestros conocimientos acerca de la ecología de *C. gattii*, su ciclo de vida en la naturaleza y su asociación con estos árboles.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Córdoba por la financiación de este trabajo y al Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, por proporcionar las cepas empleadas como control.

Bibliografía

- [1] Arrazola P, Buelvas D, Arrieta D, Pastrana Y. Aprovechamiento de las características nutricionales del almendro de la India (*Terminalia catappa* L.) como suplemento en la alimentación animal. Rev MVZ Córdoba 2008; 13:1205-14.
- [2] Bajpai M, Pande A, Tewari SK, Prakash. Phenolic contents and antioxidants activity of some food and medicinal plants. Int J Food Sci 2005; 56: 287-91.
- [3] Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G and Boekhout T. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *Cryptococcus gattii* hybrid. Emerg infect Dis 2008; 14: 1105-8.
- [4] Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Díaz MR, Spanjaard L, Dromer F, Hoogveld HL, Boekhout T. Unique hibryds between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. FEMS Yeast Res 2006; 6:599-607.

- [5] Byrnes III EJ, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: An emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes and infect* 2011; 1-13.
- [6] Callejas A, Ordoñez N, Rodríguez MC, Castañeda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C from the environment in Colombia. *Med Micol*. 1998; 36: 341-44.
- [7] Carrada T. Criptococosis en la era del sida. *Rev Mex Patol Clin* 2003; 50:33-40
- [8] Castañeda E. En búsqueda del hábitat de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Colombia. *Rev Acad Colomb Cienc* 2001; 25:105-14.
- [9] Contreras O, Aycardi M, Alarcón J, Jaraba A. Identificación presuntiva de *Cryptococcus gattii* aislado de *Terminalia catappa* en Montería, Córdoba, Colombia. *Rev Cubana Med Trop* 2011; 63: 117- 22 .
- [10] Ellis DH, Pfeiffer TC. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* 1990; 336: 923-5.
- [11] Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1642-44.
- [12] Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columbia livia*). *Am J Hyg* 1955; 62: 227-37.
- [13] Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37:838-40.
- [14] González-Mendoza M, Mendoza F, Mora CJ, Mendoza M, Márquez JL, y Bravo M. Valor nutricional de la semilla del almendro (*Terminalia catappa* Linn). *Revista de la Facultad de Farmacia* 2005; 47: 25-9.
- [15] Guevara-Campos J, González-Guevara L, Urbáez-Cano J, Fermín S. Meningoencefalitis por *Cryptococcus neoformans* en escolares inmunocompetentes. *Invest Clin* 2009; 50:231-9.
- [16] Kwon-Chung KJ, Polacheck I. y 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.
- [17] Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concept supports one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 2006; 6:574-87
- [18] Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennet JE. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1987; 55: 1751-4.
- [19] Martínez G, Barrial L, Illnait M, Valdés I, Fernández C, Perurena M, Polo J, y Mendoza D. Utilidad de la D-prolina en la diferenciación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*. *Rev Cubana Med Trop* 2004; 56: 77-9
- [20] Mukamurangwa P, Raes-Wuytack C. and 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.
- [21] Quintero E, Castañeda E, Ruiz A. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22:93-8.

- [22]** Staib F. Sampling and isolation of *Cryptococcus neoformans* from indoor air with the aid of the Reuter centrifugal sampler (RSC) and *Guizotia abyssinica* creatinine agar: a contribution to the mycological-epidemiological control of *Cryptococcus neoformans* in the fecal matter of caged birds. Zentralbl Bakteriolog Hyg Abt I Orig B. 1985; 180: 567-575.
- [23]** Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. Can Vet J. 2002;43: 792-794.