

Desarrollo de *Cryptococcus neoformans* en medios de cultivo empleados para diagnóstico bacteriológico*

Growth of Cryptococcus neoformans in culture media for bacteriologic diagnosis

► Amadeo Javier Bava¹, María Victoria Zuliani²

-
1. Doctor en Medicina
 2. Bioquímica

* Cátedra de Micología. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Calle 1 y 47. La Plata. Provincia de Buenos Aires. Argentina

Resumen

Se evaluó la capacidad de desarrollo de una cepa de *Cryptococcus neoformans* en cinco medios de cultivo (sin antibióticos antibacterianos) empleados habitualmente para el diagnóstico bacteriológico: agar sangre de carnero (ASC), chocolate, cisteína lactosa deficiente en electrolitos (CLDE), eosina-azul de metileno y Salmonella-Shigella (SS). Una suspensión de la cepa Cn 003, de la colección de la Cátedra de Micología, fue sembrada en la superficie de estos medios contenidos en placas de Petri que se incubaron a 28 °C y 37 °C, durante una semana. Excepto en el SS, *C. neoformans* desarrolló colonias evidenciables a simple vista en los medios evaluados. En ASC y agar chocolate, a 37 °C desarrollaron colonias mucoides mientras que a 28 °C, éstas fueron pastosas o cremosas. En todos los medios y a las temperaturas de incubación empleadas, el tamaño de las colonias fue menor que el alcanzado en el medio de Sabouraud, empleado como control. La falta de reconocimiento de las colonias de *Cryptococcus neoformans* cuando desarrollan en los medios habitualmente empleados en el diagnóstico bacteriológico puede provocar la falta de diagnóstico de la criptococosis, cuando ésta no es sospechada o bien cuando las colonias desarrollan a partir de muestras no habituales.

Palabras clave: *Cryptococcus neoformans* * criptococosis * diagnóstico bacteriológico

Summary

The ability of C. neoformans to grow in five culture media usually employed in bacteriologic diagnosis (blood agar, chocolate agar, CLDE, eosin-metilen blue and Salmonella-Shigella agars) was evaluated. A Cn 003 strain suspension, obtained from our collection was sown in these media contained in Petri dishes and incubated at 28 °C and 37 °C during one week. Except in SS agar, C. neoformans developed visually observed

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

colonies. In ASC and chocolate agar, mucous colonies developed at 37 °C, whereas at 28 °C, they were pasty and creamy. The size of the colonies was, in all the bacteriological media and temperatures employed, smaller than that observed on Sabouraud agar, used as control. No recognition of the *Cryptococcus neoformans* colonies developed in culture media usually employed for the bacteriologic diagnosis can cause a lack of cryptococcosis' diagnosis, when this disease is not suspected or develops from unusual samples.

Keywords: *Cryptococcus neoformans* * cryptococcosis * bacteriologic diagnosis

Introducción

La criptococosis es una micosis sistémica de distribución geográfica cosmopolita, cuya presencia se asocia con diversos defectos de la inmunidad mediada por células, principalmente al SIDA (1).

La diseminación hemática de *Cryptococcus neoformans* provoca múltiples localizaciones, de las cuales sobresale el sistema nervioso central, donde suele provocar meningitis o meningoencefalitis de evolución aguda, sub-aguda o crónica, según la intensidad del defecto inmunológico (2). Sin embargo, el hígado, el bazo, la médula ósea, los riñones, la piel y el tejido celular subcutáneo, por mencionar algunos, no escapan a la agresión de esta levadura (3).

Por ello, el aislamiento del agente causal, puede lograrse a partir de varios de los materiales clínicos procesados: principalmente de líquido cefalorraquídeo, y en menor medida de orina, sangre, secreciones respiratorias, material de punción de médula ósea y de escarificación de lesiones cutáneas (4).

La elevada incidencia actual de la criptococosis, originada por su asociación al SIDA, y la posibilidad de recuperar su agente causal en laboratorios no especializados en el diagnóstico micológico, puede llevar a la omisión, confusión o la falta de reconocimiento de este importante patógeno fúngico.

El propósito de este trabajo fue determinar las características del desarrollo de *C. neoformans* en cinco medios de cultivo habitualmente empleados para el diagnóstico bacteriológico.

Materiales y Métodos

Fueron empleadas placas de Petri de plástico, estériles, que contenían aproximadamente 20 mL de los siguientes medios de cultivo: agar chocolate, agar nutritivo adicionado con sangre de carnero al 5% (ASC), agar Salmonella-Shigella (SS), agar cisteína lactosa deficiente en electrolitos (CLDE) y agar eosina-azul de metileno (EMB).

Como control fueron empleadas placas de Petri que contenían agar glucosado de Sabouraud (AGS) y

en todos los casos fue omitido el agregado de antibióticos antibacterianos a los medios.

Dos placas de cada uno de los medios fueron sembradas con una suspensión en solución fisiológica estéril de la cepa Cn 003 de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, perteneciente a la colección de la Cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

La siembra se realizó en todos los casos mediante la estriación del inóculo (equivalente al 0.5 de la escala de Mc Farland) con un ansa bacteriológica sobre la superficie del medio.

Una placa sembrada de cada uno de los medios fue incubada en estufa de cultivo a 28 °C y 37 °C durante una semana, y luego observada para establecer las características macro y microscópicas de las colonias desarrolladas.

Una suspensión en solución fisiológica de las colonias desarrolladas fue observada al microscopio, entre porta y cubreobjetos, con el agregado de tinta china, a los efectos de evidenciar la presencia de cápsula y comparar el tamaño de la misma en las colonias desarrolladas a 28 °C y 37 °C, en cada uno de los medios.

Resultados

La cepa de *C. neoformans* empleada logró desarrollar colonias visibles en todos los medios evaluados, con excepción del SS, tras una semana de incubación, tanto a 28 °C como a 37 °C (Figs. 1 a 6).

En SS, el desarrollo estuvo representado por una pátina, prácticamente imperceptible a simple vista (Figura 6), compuesta por colonias minúsculas que correspondieron microscópicamente a levaduras redondeadas con escasa cápsula.

Llamativamente, tanto en ASC como en agar chocolate (Figs. 2 y 3), las colonias que desarrollaron a 37 °C presentaron, tras una semana de incubación, un aspecto "mucoide", muy similar al observado en las colonias de los bacilos gramnegativos de *Klebsiella pneumoniae*. Aquellas colonias desarrolladas en los mismos medios a 28 °C se mostraron pastosas, de tamaño algo menor, similares a las que originan las bacterias del gé-

nero *Corynebacterium*. En ASC, a 28 °C, y en menor medida a 37 °C, se observó un halo de hemólisis alrededor de las colonias desarrolladas, tal cual puede observarse en la Figura 2.

Ambos tipos de colonias mostraron un tamaño menor al que adquirieron luego de una semana de incubación, en el AGS (Fig. 1), tanto a 28 °C como a 37 °C, donde desarrollaron con un aspecto uniformemente cremoso.

Las preparaciones microscópicas con tinta china, revelaron un tamaño mayor de la cápsula en las células provenientes de las colonias mucoides, aunque con una diferencia escasa respecto de las cremosas.

Discusión

La criptocosis constituye hoy en día, tras la eclosión del SIDA y otras causas de inmunodepresión (cánceres, trasplantes y tratamientos antitumorales), una micosis de frecuente observación, que puede eventualmente diagnosticarse en laboratorios no especializados en Micología (1).

El carácter diseminado que adquiere, posibilita la recuperación de su agente causal, el *Cryptococcus neoformans*, a partir de variados materiales clínicos, los cuales son cultivados en los correspondientes medios a la espera del desarrollo de eventuales patógenos.

Si bien el reconocimiento de las colonias de esta especie es sencillo cuando se cuenta con un examen microscópico previo con tinta china que revela levaduras capsuladas, no ocurre lo mismo cuando este último es negativo, la presencia de *Cryptococcus neoformans* no se sospecha o bien se trata de cultivos de materiales que habitualmente no se procesan con microscopía previa (4).

Las colonias de *C. neoformans* poseen en un principio, cuando desarrollan en AGS o similares, un aspecto cremoso y un color blanquecino, que va tornándose en canela con el correr de los días (5). Estas características hacen posible su confusión, en un pri-

mer momento, con otras especies de levaduras, principalmente con *Candida*, la cual es la más frecuentemente recuperada de materiales clínicos (2).

Si bien la velocidad de crecimiento de *C. neoformans* es en general rápida (aunque menor a la de *Candida albicans*), y las colonias se hacen visibles en menos de una semana (2 a 4 días en promedio), la misma puede excepcionalmente extenderse a varias semanas en casos particulares, dando lugar incluso al desarrollo de "colonias puntiformes", tras varias semanas de incubación (5).

La ausencia de antibióticos obedece a la idea de imitar las condiciones de cultivo que se presentaran en un laboratorio de bacteriología al sembrar una muestra, en la cual se busca primordialmente el desarrollo bacteriano.

La exclusión de antibióticos en los medios de cultivo evaluados podría, sin embargo, actuar desfavorablemente sobre el desarrollo de la cepa de *C. neoformans* utilizada, modificando su tamaño y forma, al eliminar la flora bacteriana antagonista, la cual puede estar presente en ciertos materiales clínicos e interferir con su desarrollo.

Igualmente, a la hora de adicionar a los medios componentes antibióticos debe tenerse en cuenta que *C. neoformans* es inhibido por la cicloheximida (Actidione®), lo cual implica un cuidado especial al agregar este antifúngico en los medios de cultivo para evitar el desarrollo de contaminantes fúngicos (2) (4).

El estudio bacteriológico de las muestras de orina requiere por lo general de la evaluación cuantitativa de los gérmenes presentes en las mismas, tras su siembra en medios tales como el EMB o CLDE, donde desarrollan con ventaja los agentes causales más frecuentes de las infecciones urinarias, en especial las *Enterobacteriaceae*.

No es raro el desarrollo de colonias de levaduras en estos medios a partir de muestras de orina, en particular del género *Candida*, las cuales pueden ser confundidas por inexperiencia con *C. neoformans*.

El empleo de una prueba rápida para determinar la producción de ureasa (la cual es positiva para *Cryptococcus* y negativa para *Candida*) y la producción de tu-



Figura 1. Desarrollo de colonias de *Cryptococcus neoformans* en agar glucosado de Sabouraud, a 28 °C y 37 °C.



Figura 2. Desarrollo de colonias de *Cryptococcus neoformans* en agar nutritivo adicionado con sangre de carnero al 5%, a 28 °C y 37 °C.

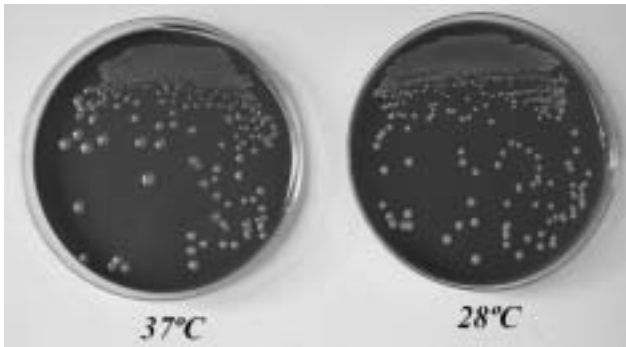


Figura 3. Desarrollo de colonias de *Cryptococcus neoformans* en agar chocolate, a 28 °C y 37 °C.

bos germinativos (positiva para *Candida* y negativa para *Cryptococcus*) pueden servir como pruebas tamiz para diferenciar ambos géneros (6).

C. neoformans puede estar presente en muestras de orina de pacientes con criptococosis asociada al SIDA y en mucho menor medida en aquellos con otras causas favorecedoras (4).

Mientras que en CLDE las colonias de *C. neoformans* aparecieron como cremosas o pastosas, de color celeste (o sea similares a los bacilos gramnegativos no fermentadores de lactosa) y de aproximadamente 1 mm de diámetro, en el EMB fueron más pequeñas y de color rosado (Figs. 4 y 5, respectivamente).

En todos los casos, un simple examen microscópico en fresco de las colonias permitirá distinguirlas de las bacterianas, e inclusive, a través de su morfología redondeada y sus brotes únicos, presumir su identidad como *Cryptococcus*. Cabe recordar que dentro de este último género sólo *C. neoformans* crece a 37 °C, temperatura a la cual se incuba la casi totalidad de los materiales procesados en los laboratorios de bacteriología.

El ASC es un medio de aislamiento primario empleado con frecuencia para múltiples materiales clínicos, en muchos de los cuales puede encontrarse el *C. neoformans*. Entre estos materiales se destacan los repi-

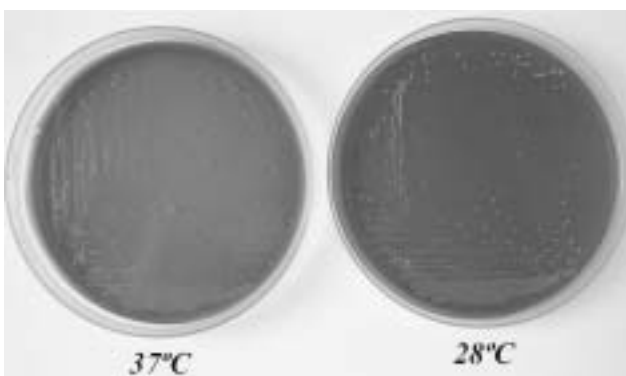


Figura 5. Desarrollo de colonias de *Cryptococcus neoformans* en agar Eosina-azul de metileno, a 28 °C y 37 °C.

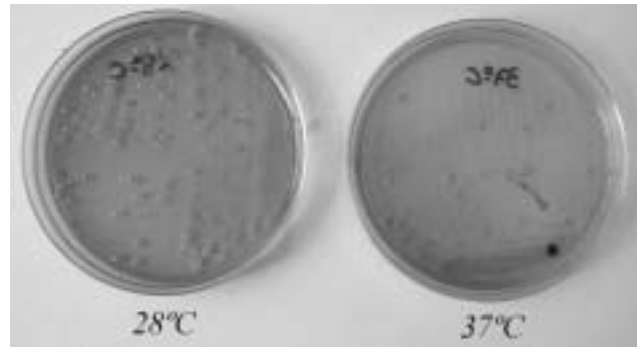


Figura 4. Desarrollo de colonias de *Cryptococcus neoformans* en agar cisteína lactosa deficiente en electrolitos (CLDE), a 28 °C y 37 °C.

ques de las muestras de hemocultivos (tanto los procesados por el método clásico como los que emplean la técnica de lisis-centrifugación), secreciones respiratorias y punciones de médula ósea, donde *C. neoformans* puede hallarse como único patógeno o acompañando de diferentes especies bacterianas.

Las secreciones respiratorias constituyen un material con características particulares, ya que la vía respiratoria es la puerta de entrada de los propágulos del hongo. La presencia de colonias de *C. neoformans* en medios inoculados con estos materiales podría pasar desapercibida para observadores inexpertos, debido a la posible confusión con levaduras del género *Candida*, por lo general sin valor patógeno en esa localización (1) (2).

En el caso particular del agar chocolate, éste es el medio de elección para la siembra de LCR, material a partir del cual se logran la mayor parte de los diagnósticos de criptococosis, teniendo en cuenta que la meningoencefalitis es su forma clínica de presentación más frecuente (1).

Cabe recordar que en muchos casos, sobre todo aquellos no asociados al SIDA, la sensibilidad de la microscopia con tinta china en el LCR es mucho menor (<60%) a la que muestra en los pacientes con SIDA

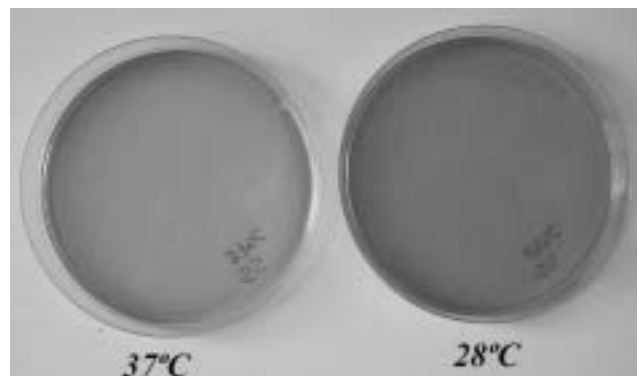


Figura 6. Desarrollo de colonias de *Cryptococcus neoformans* en agar *Salmonella-Shigella*, a 28 °C y 37 °C.

(>90%), lo que incrementa la importancia de los cultivos como método de diagnóstico (4).

El SS es un medio sumamente inhibitorio de la "flora bacteriana coliforme" presente en las heces, empleado para la recuperación en forma específica de especies de *Salmonella* y *Shigella*. El agregado del mismo en la presente experiencia obedece al hecho de que *C. neoformans* ha sido observado, aunque excepcionalmente, en muestras de materia fecal de pacientes con SIDA y criptococosis, enviadas para su estudio parasitológico (7).

En estos casos, la presencia del hongo no se debió, como podría especularse, a la existencia de lesiones intestinales, sino a la deglución de secreciones respiratorias por parte de las pacientes que padecían de criptococosis pulmonar. Llamativamente, en uno de estos casos el diagnóstico de criptococosis fue establecido a partir de la observación de las levaduras capsuladas en la materia fecal (7).

El desarrollo de colonias mucoides por parte de algunas cepas de *C. neoformans* ha sido asociado a la mayor producción de polisacárido capsular, y al tamaño de la cápsula, en ocasiones como consecuencia de una habilidad propia y en otras producto de las condiciones de incubación "in vitro" (8).

Como regla general, independientemente del material inoculado, el desarrollo de colonias de levaduras en medios de cultivo bacteriológicos incubados a 37 °C, que microscópicamente estén compuestas por células redondas y que dan positiva la prueba de producción de ureasa, deben considerarse como *C. neoformans*, hasta que se demuestre lo contrario.

La confirmación de la identificación presuntiva puede hacerse en forma sencilla y económica investigando la producción de fenoloxidasas en medio de agar extracto de semillas de girasol, donde esta especie (y no otra del mismo género u otros géneros de levaduras) desarrolla colonias de color pardo (9).

El aumento de la incidencia de las micosis en general y de la criptococosis en particular, requiere de un incremento paralelo de la capacidad de los profesionales y técnicos del laboratorio para sospechar en principio y reconocer luego la presencia de *C. neoformans* en los materiales clínicos.

CORRESPONDENCIA

PROF. DR. AMADEO JAVIER BAVA
Darregueyra 2470. 7° "C"
1425 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES
Argentina
E-mail: javibava@biol.unlp.edu.ar

Referencias bibliográficas

1. Mitchel TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the Era of AIDS-100 Years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 515-48.
2. Rippon JW. Medical Mycology. The Pathogenic *Fungi* and the Pathogenic *Actinomycetes*. 3rd Ed: WB Philadelphia WB Saunders; 1988.
3. Bava AJ, Arechavala A, Negroni R, Robles AM, Bianchi M. Cryptococcosis associated with AIDS in the Muñiz Hospital of Buenos Aires. Mycopathologia (Deen Haag) 1997; 140: 13-7.
4. Bava AJ. Métodos directos para el diagnóstico de la criptococosis. Rev Argent Infectol 1996; 9: 16-21.
5. Bava AJ, Finkelievich J, Lantos J, Trujillo J, Falcón J. Criptococosis humana producida por una variante puntiforme de *Cryptococcus neoformans*. Rev Argent Miccol 1990; 12: 12-6.
6. Bianchi MH, Bava AJ. Método rápido para la determinación de la actividad ureásica de las levaduras. Acta Bioquim Clin Latinoam 1995; 29: 527-30.
7. Bava AJ, Viola M, Macías J. Presencia de *Cryptococcus neoformans* en materia fecal de una paciente diarreica con SIDA. Prensa Méd Argent 2001; 88: 286-9.
8. Bava AJ, Llanos C, Boggiano E, Mestroni S. La cápsula, parte del sistema inmune de *Cryptococcus neoformans*". Rev Argent Infectol 1999; 12: 3-9.
9. Bava AJ. Criptococosis en la República Argentina. Tesis de Doctorado. Rev Argent Miccol 1996; 16: 1-41.

Aceptado para su publicación el 17 de abril de 2009