

DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* EN UN GRUPO DE COLOMBOFILOS

CARMEN SOFIA CORRALES*, NELLY ORDOÑEZ*, LUISA MARCELA LONDOÑO*, ELIZABETH CASTAÑEDA*

Se evaluó la respuesta humoral, medida como anticuerpos específicos anti-*Cryptococcus neoformans*, en 69 sueros de un grupo de colombófilos de Bogotá; grupo considerado como de alto riesgo dado el frecuente contacto con el material contaminado con el microorganismo. Además se estudiaron 65 sueros de un grupo control constituido por personas dedicadas a actividades diferentes.

En las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y aglutinación en tubo, no se evidenció diferencia entre los niveles de anticuerpos de ambos grupos.

Se estudiaron adicionalmente 15 palomares con el objeto de aislar el microorganismo lo que se logró en el 66,7% de ellos. En 8 de los aislamientos se hizo serotipificación del hongo encontrándose que la totalidad correspondía a *C. neoformans* var. *neoformans*.

INTRODUCCION

En 1951 y por primera vez Emmons aisló del suelo el *Cryptococcus neoformans*, un hongo monomórfico, basidiomiceto y agente etiológico de la criptococosis⁽¹⁾, siendo éste el inicio de muchas experiencias en este campo^(2, 4).

En la actualidad, con el desarrollo de nuevas técnicas para la recuperación e identificación completa del *C. neoformans* se han realizado un gran número de estudios epidemiológicos y ha quedado establecido que las excretas de palomas (*Columba livia*) son la fuente principal para la distribución y mantenimiento de la levadura en la naturaleza^(5, 7).

En Oklahoma se informaron 4 casos de meningitis por *C. neoformans* en individuos que vivían en un

área habitada por palomas⁽⁸⁾, esto llamó la atención hacia el guano de las palomas como fuente de infección^(9, 10). Basados en la cuantificación de anticuerpos anti-*C. neoformans*, Walter y Atchison concluyeron que las personas aficionadas a la cría de palomas (colombófilos) tenían un riesgo mayor de infección con el hongo⁽¹¹⁾.

El propósito de este trabajo fue el de realizar en nuestro medio un estudio comparativo de la respuesta humoral específica contra el hongo, medida como anticuerpos, en un grupo de colombófilos y en un grupo control. Como dato complementario se intentó el aislamiento del *C. neoformans* de los palomares de los colombófilos estudiados y la serotipificación de esos aislamientos en el medio con canavanina, glicina y azul de bromotimol (CGB), descrito por Kwon-Chung⁽¹²⁾.

*Laboratorio de Micología Médica. Grupo de Microbiología. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, D.E.

MATERIALES Y METODOS**Población:**

Estuvo constituida por dos grupos, como sigue:

1. Colombófilos: 69 personas asintomáticas, 48 hombres y 21 mujeres, dedicadas a la cría y mantenimiento de palomas mensajeras, o familiares de éstos quienes también tenían contacto cotidiano con palomas. Las edades de los miembros de este grupo oscilaron entre los 10 y 60 años.
2. Control: 65 personas sanas, 28 hombres y 37 mujeres con edades entre los 10 y 60 años, los cuales no tenían contacto habitual con palomas.

Muestras:

De cada una de las personas de estos dos grupos se tomaron 10 ml de sangre para posterior obtención de suero; éste se almacenó a -70°C hasta su procesamiento.

Pruebas serológicas:

Fueron realizadas las siguientes pruebas:

1. Inmunofluorescencia indirecta para demostrar anticuerpos contra *C. neoformans*⁽¹³⁾: se consideró como positivo cualquier suero que reaccionara a una dilución mayor o igual a 1:16.
2. Inmunofluorescencia indirecta para demostrar anticuerpos contra *Candida albicans*⁽¹³⁾: la positividad se consideró como en el caso anterior.
3. Aglutinación en tubo empleando levaduras de *C. neoformans*⁽¹³⁾ y tomando como positivo el suero que produjera aglutinación a una dilución mayor o igual a 1:8.
4. Presencia del antígeno polisacárido de *C. neoformans*, mediante la técnica de aglutinación de partículas de latex, en el suero de las personas en estudio⁽¹³⁾. Se empleó reactivo comercial (Meridian Diagnostic).

Excremento de palomas (palomina):

En 15 palomares se tomaron muestras del guano de las palomas a partir de nidos, repisas, suelos y tejados.

Cada muestra tenía aproximadamente, 18 a 20 g de material seco y era recolectada en bolsas plásticas, empleando un bajalenguas estéril. Las muestras se almacenaron durante 24 horas a 4°C antes de su procesamiento.

Procesamiento:

Las muestras se procesaron según la técnica de Civiola y Conti-Díaz⁽¹⁰⁾. Diez g del material, se extrajeron con 30 ml de solución salina estéril, después de un período de agitación de 2 minutos y un reposo de 10 minutos, se recolectaron 8 ml del sobrenadante, tomado de diferentes niveles, a este sobrenadante se le adicionaron 2 ml de una solución con antibióticos (4,5 mg de penicilina y 10 mg de estreptomycin por ml); posteriormente se sembraron 3 gotas de cada uno en cajas de Petri que contenían medio de ácido caféico adicionado de antibióticos⁽¹⁴⁾. En este medio las colonias de *C. neoformans* pueden ser distinguidas macroscópicamente por presentar un pigmento café producto de la acción de la fenol oxidasa del microorganismo sobre el substrato. Las cajas fueron selladas con cinta de enmascarar se envolvieron en papel de aluminio y se incubaron a 28°C ; siendo observadas periódicamente durante 15 días.

Identificación:

Las colonias que tuvieron una morfología característica de levadura que fueran de color café (compatibles con *C. neoformans*), fueron observadas al microscopio, determinándose la presencia o ausencia de cápsula mediante la técnica de tinta china⁽¹⁵⁾. Posteriormente fueron reaisladas en agar glucosado de Sabouraud a 28°C .

La identificación final de las colonias sospechosas, se realizó con base a las siguientes pruebas:

1. Crecimiento a 37°C .
2. Hidrólisis de la úrea⁽¹⁶⁾.
3. Asimilación de carbohidratos según la técnica modificada de Wickerham⁽¹⁷⁾.

Tipificación:

Se realizó en el medio CGB⁽¹²⁾, con incubación a 27°C por 24 a 72 horas.

Precauciones:

Se tomaron como precauciones para la recolección y el procesamiento de las muestras, el uso de máscara y guantes.

RESULTADOS**Pruebas serológicas:**

En la prueba de aglutinación en tubo, para medir anticuerpos contra *C. neoformans*, se observó que la positividad de la población de colombófilos era del 0,70% y la del grupo control de 0,65% (Tabla 1).

En la prueba de inmunofluorescencia indirecta para criptococosis, en diluciones del suero al 1:16, el grupo de colombófilos presentó una positividad de 2,9% y el grupo control de 3,1%, como se observa en la misma tabla. En la prueba de inmunofluorescencia para *Candida albicans* fueron positivos 33,33% del grupo de colombófilos y 52,3% del grupo control (Tabla 1).

En los 4 sueros que a la inmunofluorescencia indirecta, presentaron anticuerpos anti-*C. neoformans* se practicó la prueba de aglutinación de partículas de latex para detectar antígeno. Sólo uno de estos sueros fue positivo en una dilución de 1:2; sin embargo, una segunda muestra de esta misma persona (colombófilo), tomada dos meses después de la muestra inicial fue negativa.

TABLA 1. ANTICUERPOS ANTI - *C. NEOFORMANS* EN COLOMBOFILOS Y CONTROLES

GRUPO	PRUEBAS SEROLÓGICAS POSITIVAS					
	AGLUTINACIÓN		I F I ^A			
			C. NEOFORMANS		C. ALBICANS	
	No.	%	No.	%	No.	%
COLOMBOFILOS	1	0,70	2	2,9	35	33,3
CONTROL	1	0,65	2	3,1	34	52,3

^AIFI = INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Aislamiento de levaduras del género *Cryptococcus*:

De las 75 muestras de palomina procesadas se aislaron 22 levaduras (30%) del género *Cryptococcus* (Tabla 2). El 82% de estos aislamientos correspondió al *C. neoformans*, pero también se aislaron *C. terreus* (4,5%), *C. uniguttulatus* (9,1%) y *C. albidus* (4,5%) (Tabla 2).

En 10 de los 15 palomares (66,7%) examinados, se obtuvieron aislamientos de *C. neoformans*. La distribución de los palomares según el número de aislamientos se expresa en la tabla 3.

TABLA 2. DISTRIBUCION POR ESPECIES DE LOS AISLAMIENTOS DEL GENERO *CRYPTOCOCCUS* OBTENIDOS DE PALOMARES

ESPECIES	AISLAMIENTOS	
	No.	%
<i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	18	81,9
<i>CRYPTOCOCCUS UNIGUTTULATUS</i>	2	9,1
<i>CRYPTOCOCCUS TERREUS</i>	1	4,5
<i>CRYPTOCOCCUS ALBIDUS</i>	1	4,5
TOTAL	22	

TABLA 3. DISTRIBUCION DE LOS PALOMARES SEGUN EL NUMERO DE AISLAMIENTOS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

NO. DEL PALOMAR	NO. AISLAMIENTOS	TOTAL AISLAMIENTOS
1,2,4,7,8	0	0
5,6,9,10,11	1	5
13,14	2	4
3,12,15	3	9

Serotipificación:

De los 18 aislamientos de *C. neoformans*, 8 fueron serotipificados, correspondiendo todos ellos a *C. neoformans* var. *neoformans*, serogrupos A y D.

DISCUSION

Al determinar por aglutinación en tubo la presencia de anticuerpos anti-*C. neoformans* en los sueros de los colombófilos, no se encontró ninguna diferencia con el grupo control; lo mismo sucedió en la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Ello nos permite considerar varias explicaciones para la ausencia de anticuerpos, la primera de las cuales sería el que a pesar de tener los colombófilos un prolongado (5-20 años) y estrecho contacto con material contaminado con *C. neoformans*, sin haber empleado protección durante la limpieza de los palomares, no hay anticuerpos porque el antígeno capsular no es muy inmunogénico. Observaciones hechas por otros autores ayudan a sustentar esta hipótesis^(18, 19).

La otra posibilidad sería la poca sensibilidad de las técnicas empleadas para medir anticuerpos; finalmente cabría la posibilidad de que la inhalación masiva del antígeno pudiera estar frenando el sistema humoral específico por un fenómeno de tolerancia^(21, 23). Esta última posibilidad requeriría un estudio más a fondo.

Por otro lado, la discrepancia con los resultados obtenidos por Walter y Atchison⁽¹¹⁾, quienes demostraron que las personas dedicadas a la cría de palomas tienen un riesgo más alto de contaminación con el *C. neoformans*, pueden ser explicadas con base en diferencias metodológicas. Por el contrario Diamond comenta que no hay predisposición ocupacional para el que cría palomas y que, por consiguiente, el contacto con palomas no tiene ningún significado para el diagnóstico⁽²¹⁾.

Sería interesante medir inmunidad celular ya que Lacaz demostró cómo al practicar pruebas intradérmicas con criptococcina, el índice de personas infectadas y que no presentaban enfermedad era del 6%⁽²⁴⁾. Asimismo, las pruebas intradérmicas en otras entidades (histoplasmosis, coccidioidomicosis), han sido de gran

importancia para la detección de infecciones sub-clínicas y de casos epidémicos⁽²⁵⁾.

La prueba de inmunofluorescencia indirecta para *Candida albicans* fue utilizada en este estudio como una prueba control; ella señaló la no alteración en la capacidad de producir anticuerpos por parte de los colombófilos, los que dieron un 33,3% de positividad, siendo los controles reactivos en un 52,3%.

La prueba de latex dio reactiva (dilución 1:2) en solo una persona del grupo de colombófilos, pero una nueva nuestra fue negativa, ello señala un posible falso positivo en la primera muestra.

Anotamos la alta proporción de contaminación con *C. neoformans* (66,6%) de los palomares estudiados. Al comienzo de este trabajo se mencionó cómo el guano de las palomas constituye un medio propicio para el desarrollo y proliferación del hongo, siendo tal guano o la tierra enriquecida con este material una posible fuente de contaminación para el humano^(5, 11).

La variedad de *Cryptococcus* aislado de los palomares fue el *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D) lo cual confirma las observaciones hechas anteriormente por Muchmore et al y Bennett et al; quienes lo aislaron de todas las muestras de tierras estudiadas, incluyendo muestras de regiones donde se habían realizado aislamientos clínicos serotipos B, C^(26, 27).

SUMMARY

Humoral responses measured as antibodies against *C. neoformans*, were measured in 69 pigeon breeders and in 65 people with different activities. Our results showed that there was no difference between specific antibodies in these two groups. However, *C. neoformans* was isolated in 66.7% of the pigeon droppings. Serotyping of 8 isolates in the CGB medium was: *C. neoformans* var. *neoformans*, in all of them.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a la doctora Angela Restrepo de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) por sus valiosos comentarios en la corrección del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. Emmons CW. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J Bacteriol. 1951; 62: 685-689.
2. Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba Livia*). Am J Hyg. 1955; 62: 227-232.
3. Ajello L. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soil. Am J Hyg. 1958; 67: 72-77.
4. Emmons CW. Natural occurrence of opportunistic fungi. J Lab Invest. 1962; 11: 1026-1032.
5. Emmons CW. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. Public Health Reports. 1960; 75: 362-364.
6. Swinne-Desgain D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. Sabouraudia. 1975; 13: 303-308.
7. Ajello L. Natural habitats of the fungi that cause pulmonary mycoses. Medical Mycology. Zbl Bakt Suppl 8 pp 31-42. Verlag. Stuttgart, New York. 1980.
8. Muchmore HG, Rhoades ER, Nix GE, Felton FG, Carpenter RE. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in the environment of three geographically associated cases of cryptococcal meningitis. New Eng J Med. 1963; 268: 1112-1114.
9. Mira CA, Anzola R, Martínez A, Llinás R, Valencia C, Restrepo A. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de materiales contaminados con excretas de palomas de Medellín, Colombia. Antioquia Médica. 1968; 18: 33-40.
10. Civilia E, Conti Díaz I. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de excretas secas de palomas en la ciudad de Montevideo. Rev Uruguaya Pat Clin Microbiol. 1976; 3(2): 41-48.
11. Walter JE, Atchison RW. Epidemiological and immunological studies of *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol. 1966; 92: 82-87.
12. Kwon-Chung K, Polachek 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(3): 535-537.
13. Palmer D, Kaufman L, Kaplan W, Cavallaro J. Serodiagnosis of Mycotic Diseases. Charles C Thomas. Springfield Ill. 1977; pp 76-106.
14. Fleming WH, Hopkins JM, Land GA. New culture medium for the presumptive identification of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1977; 5: 236-243.
15. Halley L, Callaway C. Laboratory Methods in Medical Mycology 1978 HEW Publication No. (CDC) 78-8361.
16. Steeliger H. Use of urease test for the screening and identification of *Cryptococci*. J Bacteriol. 1956; 72: 127-131.
17. Adams ED, Cooper BH. Evaluation of a modified Wickerham Medium for Identifying Medically Important yeasts. Amer J Med Technol. 1974; 40: 377-388.
18. Bergman F, Stormby K. A study of white blood cell and antibody responses in mice infected subcutaneously with *Cryptococcus neoformans*. Sabouraudia 1965; 4: 106-111.
19. Kozei TR, Gulley WF, Cazin Jr. Immune response to *Cryptococcus neoformans* soluble polysaccharide: immunological unresponsiveness. Infect Immun. 1977; 18: 701-707.
20. Diamond R. *Cryptococcus neoformans*. In: Mandell RG, Douglas JR, Bennett JE, (eds). Principles and practice of Infectious Diseases. 1979; pp 2023-2034. John Wiley & Sons, New York.
21. Goren MB. Experimental murine Cryptococcosis: effect of hyperimmunization to capsular polysaccharide. J Immunol 1967; 98: 914-922.
22. Murphy JW, Cozad GC. Immunological unresponsiveness induced by cryptococcal capsular polysaccharide assayed by the hemolytic plaque technique. Infect Immun. 1972; 5: 896-901.
23. Fromtling RA, Shadomy HJ. Immunity in cryptococcosis: An overview. Mycopathologia. 1982; 77: 183-190.
24. Lacaz C da Silva, Melhem M. Survey of immunoallergic reactions with cryptococcal among a police battalion in Sao Paulo. The black and white yeasts. Pan American Health Organization Publication No. 356. 1978; pp 274-276.
25. Levin S. The fungal skin test as a diagnostic hindrance. J Inf Dis. 1970; 122: 343-344.
26. Bennett JE, Kwon-Chung K, Howard D. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol. 1977; 105: 582-586.
27. Muchmore H, Scott E, Felton F, Fromtling R. *Cryptococcus neoformans* serotype groups encountered in Oklahoma. Am J Epidemiol. 1980; 112: 32-38.