

102
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION DE LA PRUEBA DE
AGLUTINACION EN LATEX PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA CRIPTOCOCOSIS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A I

MA. DE JESUS OLEA SALGADO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pags.
INTRODUCCION-----	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	12
HIPOTESIS-----	13
OBJETIVOS-----	14
DISEÑO EXPERIMENTAL-----	15
MATERIAL Y METODOS-----	16
1) Hongos-----	16
2) Curva de crecimiento-----	17
3) Obtencion del antígeno-----	17
4) Obtencion de suero hiperinmune anti- <u>Cryptococcus neoformans</u> .-----	20
5) Purificación de la fracción gamma-globulina-----	22
6) Sensibilización de las partículas de látex.-----	23
7) Determinación de la máxima dilución reactiva de la suspensión de partículas de látex sensibilizadas con gamma globulina anti- <u>C. neoformans</u> .-----	24
8) Muestras biológicas utilizadas en la prueba de aglutinación en látex (PAL)-----	26
9) Desarrollo de la prueba para la determinación del antígeno polisacarídico en las muestras biológicas-----	27
RESULTADOS-----	29
DISCUSION-----	38
CONCLUSIONES-----	46
FIGURAS-----	54
TABLAS-----	57
ANEXO-----	47
BIBLIOGRAFIA-----	73

INTRODUCCION

La criptococosis es una infección crónica, subaguda o raramente aguda, pulmonar, generalizada, o meníngea, causada por un hongo levaduriforme oportunista, denominado Cryptococcus neoformans. Esta se adquiere a través de la inhalación de las blastoconidios. Por la vía de entrada de este hongo la infección primaria casi siempre es pulmonar, y puede ser subclínica y transitoria, o comportarse como oportunista. Entre los factores de oportunismo más importantes que se asocian a esta enfermedad se encuentran: terapia de corticoesteroides (53,102), trasplantados, deficiencia en número o función de células T (72,102), de neutrófilos o macrófagos, enfermedad de Hodgkin (11,13,68,89), y recientemente ocurre en los pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (15,16,17,20,55,56). Aunque C. neoformans en la mayoría de los casos penetra al organismo por vía respiratoria por ser neurofilico, fácilmente se disemina por vía linfática y hematógena hacia el sistema nervioso central (13,89).

En 1894 Busse y Buschke aislaron en Alemania una levadura capsulada y la llamaron Saccharomyces hominis. En Italia en el mismo año, Sanfelice aisló de jugo de pera una levadura capsulada y la llamó Saccharomyces neoformans. En 1901 Vuillemin lo clasificó dentro del género Cryptococcus,

y finalmente se le clasifico como Cryptococcus neoformans por Lodder y Kreger-Van Rij en 1952 (13,65,89).

Los primeros aislamientos de C. neoformans que se reportaron ocurrieron a partir de frutas citricas ademas de duraznos, peras, etc., posteriormente se le aislo de leche y sus derivados; sin embargo, su habitat esta asociado al excremento de palomas o de pichón y gallinas (89). Por lo tanto es comun su aislamiento de nidos de pichones en áticos, cúpulas y cornizas. En este ambiente se encuentra compartiendo el sustrato alcalino rico en nitrogeno y sal con Geotrichum candidum, y unas cuantas especies de Candida y Rhodotorula (57,89). De esta forma las palomas y otras aves se convierten en hospederos o vectores que mantienen al microorganismo, pero no adquieren la enfermedad. Esto se atribuye a la temperatura corporal de estas aves que es de 40-42°C, en la cual el microorganismo sobrevive pero no se reproduce; pasa a través del intestino y es posible encontrarlo viable en las excretas de estas aves (13,89). No existe diferencia importante en la frecuencia de la infección, que pueda relacionarse con la edad, raza y ocupación. Al parecer los trabajadores de establos, gallineros y palomares estan mas expuestos a esta levadura e incluso tienen titulos de anticuerpos especificos altos, pero no presentan indice mayor de infección, ya que se requiere de factores predisponentes, en especial de severa

inmunodepresión para que esta enfermedad se establezca (89).

C. neoformans es un hongo levaduriforme capsulado que mide de 2.5 - 8 μ m de diám y con todo y capsula llega a medir de 15-20 μ m (13,89). La capsula varía con la cepa y con el medio que se utiliza. La gemación es sencilla o doble, y a veces se observan varias gemas. Macroscópicamente las colonias se observan limitadas, mucoides, convexas, de color blanco-amarillento, y en agar alpiste negro (Guizotia abyssinica), se generan colonias con pigmento café-marrón, que lo distingue entre otras especies y géneros(1,47,84,95). Para poder diferenciar al C. neoformans de otras especies de Cryptococcus, se utiliza un perfil bioquímico de carbohidratos (auxanograma), patogenicidad en el ratón, desarrollo de pigmento en agar alpiste negro y crecimiento a 37°C (1,21,54). La capsula de C. neoformans es un factor de virulencia bien estudiado por diferentes autores (41,46,48,49,57,104). El análisis químico de esta, muestra la presencia de manosa, xilosa y ácido glucurónico; esta fracción denominada glucuronoxilomanana (GXM), es el polisacárido específico principal producido por la levadura y que se ha encontrado también en el filtrado de cultivo de C. neoformans. Otra fracción hallada contiene galactosa como constituyente principal así como xilosa y manosa, a ésta se le llamó galactoxilomanana (GalXM). La especificidad de serotipos recae en el

polisacarido ácido (GXM) (48,57) y además, se ha demostrado que éste es inhibidor de la fagocitosis (25,26,55,58,59,65).

El agente etiologico de esta micosis en su fase asexual es una levadura ampliamente distribuida en la naturaleza y unico agente causal de la criptococosis. Pertenecce a la subdivision Deuteromycotina, orden Cryptococcales, familia Cryptococaceae y género Cryptococcus (13,89). Este hongo posee dos variedades: C. neoformans var. neoformans y C. neoformans var. gattii. Así mismo Benham describió 4 serotipos : C. neoformans var neoformans serotipos A y D, y C. neoformans var gattii serotipos B y C (32,47,48,49,93). Ikeda et al. (47,48) estudiaron por medio del análisis antigénico (aglutinación en placa y métodos de adsorción) diferentes factores antigénicos para cada serotipo. Para los serotipos A y D reconocieron los factores 1,2,3,7 y 1,2,3 y 8 respectivamente. Para los serotipos B y C encontraron 1,2,4,5, y 1,4,6 respectivamente. Se ha descrito su fase sexual que pertenece a la subdivisión Basidiomycotina, ya que hasta ahora es el unico de los hongos patogenos que se reproduce sexualmente por basidiosporas (61,57). Los estados perfectos corresponden a: Filobasidiella neoformans y F. bacillispora.

Debido a que la criptococosis es una enfermedad cosmopolita, se han reportado casos de diversas partes del mundo (7,18,22,62,80,90,94). Kwon-Chung y Bennett (7,57) han

encontrado que el serotipo A, es el mas común de un hábitat natural o clínico, y en E.E.U.U. corresponde al 95% de los casos clínicos.

El serotipo D es común en la mayor parte de Europa (Italia, Dinamarca, Alemania y Suiza) y otras regiones de clima templado. En el sur de California 25 de 45 aislamientos demuestran el serotipo C de la var. gattii (57). En los pacientes con SIDA, en E.E.U.U. la mayoría de los aislamientos pertenecen a la var. neoformans así como en Africa central y en todo el mundo (20,57,62,90,92). Recientemente se han reportado casos de infección con C. albicans en pacientes con SIDA (57,89).

En México se ha aislado de frutas, leche, excretas de paloma, y del suelo(18). Sin embargo, en nuestro país la epidemiología de esta enfermedad no está bien establecida, ya que no existen datos epidemiológicos sobre las zonas endémicas de este microorganismo(65). Pero es claro que con el advenimiento del SIDA la incidencia de criptococosis se ha incrementado notablemente(114,15,38).

Según Bonifaz (13), la criptococosis presenta clínicamente las siguientes formas: Pulmonar (23%), del sistema nervioso central SNC (45%), cutánea (10%), diseminada (15%), y ósea (5%).

La criptococosis pulmonar (17,89) en el ser humano casi siempre es la forma primaria de infección y en la mayoría de

los casos cursa en forma asintomática o subclínica. Los pocos casos sintomáticos incluyen: fiebre ligera, dolor pleurótico, malestar y pérdida de peso, aunque estos signos son poco notables, también se produce esputo mucoso escaso, y rara vez hemoptisis. Las lesiones se pueden desarrollar en cualquier parte del pulmón. A menudo son bilaterales, aunque se pueden presentar en un sólo lobulo. Es posible que se confunda con infecciones neumocócicas, tuberculosis, etc. El curso de la infección puede ser fulminante, o resolverse espontáneamente. A la exploración física se detecta murmullo vesicular y estertores inconstantes. Los rayos X dan una variedad de imágenes: infiltración que simula tuberculosis, neoplasias, abscesos pulmonares, etc (13,29). La forma clínica del SNC también frecuente (5,19,23), actualmente se ha incrementado notablemente en los pacientes con SIDA. Se origina a partir del foco pulmonar, posterior a una diseminación hematogena (estado secundario). La criptococosis del SNC puede presentarse de tres formas: meningitis (97 %), meningoencefalitis (2 %), y criptococomas (1 %) (5,13,88,89). La meningitis es la más frecuente, se manifiesta en forma crónica y gradual (13,19). La meningoencefalitis es una variedad clínica rara, casi siempre de curso agudo y fulminante (13,33,89). Por último, el criptococoma es una variedad extraordinariamente rara, se conforma de masas fúngicas que se desarrollan

principalmente en el cerebro, en forma de abscesos que regularmente se confunden con neoplasias (64). La predilección del C. neoformans hacia SNC, no es muy clara, es probable que el microorganismo encuentre menor respuesta celular fagocítica (26,33,44,52,75), además de la presencia de sustancias como la asparagina y creatinina que estimulan su desarrollo (7,84,89), así como la presencia de catecolaminas en el cerebro, relacionadas con el sustrato de la fenol oxidasa presente en el microorganismo (60,84,85,88).

Debe mencionarse que investigaciones recientes, en pacientes con SIDA, han demostrado la persistencia de C. neoformans en el tracto urogenital, aun después de tratamiento exhaustivo de la meningitis criptocócica, sin presentar sintomatología clínica, ni hallazgos micológicos positivos en suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), y orina. Sin embargo los cultivos y frotis de líquido seminal se han encontrado positivos. En consecuencia, varios autores (17,38,96,97,98) consideran a la próstata como nicho de C. neoformans, probablemente debido a que la terapia con los derivados azólicos es efectiva en casi todos los órganos del cuerpo, con excepción del tracto urogenital.

El tratamiento de la criptococosis es a base de anfotericina B administrada con las indicaciones del fármaco por su elevada toxicidad (5,27,56,91,100). La 5-fluoro-

citovina (5-FC) también es útil, sin embargo su efecto terapéutico es inferior al obtenido con anfotericina B, además puede producirse resistencia al fármaco durante el tratamiento con 5-FC (5,27,56,100), y el fluconazol, de reciente creación (5,16,50,62,69,103), que tiene un gran efecto contra C. neoformans, además atraviesa la barrera hematoencefálica y casi no provoca efectos secundarios. Los esquemas terapéuticos combinados como anfotericina B más 5-fluorocitosina (23,56) y sobre todo anfotericina B con fluconazol han demostrado sinergia contra C. neoformans (103,104), obteniéndose así mejores resultados terapéuticos. Sin embargo, es claro que el éxito de la terapia depende de la rapidez del diagnóstico y del estado del paciente.

El diagnóstico de Laboratorio de esta enfermedad se realiza por medio de diferentes pruebas. Entre ellas el examen directo de material clínico con tinta China y por cultivo (12,13,34,54,92). Además se cuenta con técnicas serológicas utilizadas de forma rutinaria en países desarrollados, tanto para la detección de antígeno circulante como para la determinación de anticuerpos (3,4,22,34,51,63,68).

Las pruebas serológicas para medir los niveles de anticuerpos incluyen: La inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación, floculación con bentonita,

aglutinación de partículas de carbón vegetal, aglutinación en tubo, fijación de complemento, etc. Ninguno de los métodos anteriores han sido ampliamente usados debido a que la producción de anticuerpos durante la infección es baja, sin embargo, el polisacárido criptocóccico es liberado en gran abundancia hacia los fluidos corporales, por esta razón se introdujeron técnicas para detectar la presencia de éste como antígeno circulante (46,51,73,77,87,101). Autores como Neill y Kapros reportaron en 1950 (68) que el antígeno pudo ser detectado en tejidos de ratones, y fue demostrado por precipitación con suero hiperinmune específico. Posteriormente se demostró al antígeno soluble en LCR, orina y sangre de pacientes con criptococosis sistémica (9,10,22,62,80). Estas pruebas incluyen técnicas tales como la fijación de complemento, inhibición de la hemaglutinación, precipitación, contrainmunolectroforesis y la prueba de aglutinación en látex (22,37,51,63,68,80,81,86).

En la actualidad la prueba de diagnóstico y pronóstico mas utilizada es la prueba de aglutinación de partículas de látex, establecida por Bloomfield en 1962 (10) quien sugirió que el antígeno podía ser detectado con partículas de látex cubiertas con inmunoglobulinas de suero de conejo hiperinmune. Bennett y Bayley (68) consideraron la prueba como satisfactoria, cuando las partículas de látex aglutinaron en presencia de 30 a 60 µg de polisacárido

capsular. Sin embargo, debido a que se han reportado reacciones de cruce con el factor reumatoide (6,10,30,43,99) y con Trichosporum beigelii (70,83), generando una fuente importante de falsos positivos, se sugiere incluir en la prueba de aglutinación en látex un reactivo control para evitar estas reacciones de cruce, el cual consiste en una suspensión de partículas de látex cubiertas con inmunoglobulina de conejos no inmunizados. Tales partículas aglutinan en presencia del FR en proporciones comparables a las obtenidas con partículas sensibilizadas. Existen además otros tratamientos de las muestras como pronasa, ditiotreitól o mercaptoetanol, para incrementar la sensibilidad y disminuir las interferencias (36,39,41,87). Tomando en consideración tanto el reactivo de partículas inespecíficas como el tratamiento con sustancias como las antes mencionadas se puede distinguir entre la aglutinación de látex específica mediada por el antígeno criptococal, de las aglutinaciones inespecíficas como la dada por el factor reumatoide. Con el fin de evaluar el progreso de un paciente durante el tratamiento, la prueba debe combinarse con la detección de anticuerpos (81,89). La disminución en el título de antígeno con el aumento de anticuerpos, es de buen pronóstico. Sin embargo, la persistencia de los títulos de antígeno durante el curso del tratamiento, denota pronóstico grave y probabilidad de recaída. En algunas ocasiones, los

titulos de antígeno en el suero persisten positivos mientras que los del LCR descienden. Por tanto la alta sensibilidad y especificidad de la prueba de aglutinación en látex y su fácil desarrollo la hace una de las pruebas serológicas más confiables para esta micosis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido al aumento en la frecuencia de criptococosis, sobre todo en pacientes con SIDA en nuestro país, y a la falta de reactivos serológicos para el diagnóstico inmunológico de esta enfermedad, se planteo la necesidad de obtener los reactivos necesarios, a partir de cepas de C. neoformans aisladas de pacientes en México, para poder contar con la prueba de aglutinación en látex para el diagnóstico serológico de esta micosis.

HIPOTESIS

La prueba de aglutinación en Latex desarrollada a partir de cepas mexicanas de Cryptococcus neoformans es capaz de detectar el polisacárido capsular criptocócico como antígeno circulante en pacientes con criptococosis.

OBJETIVOS

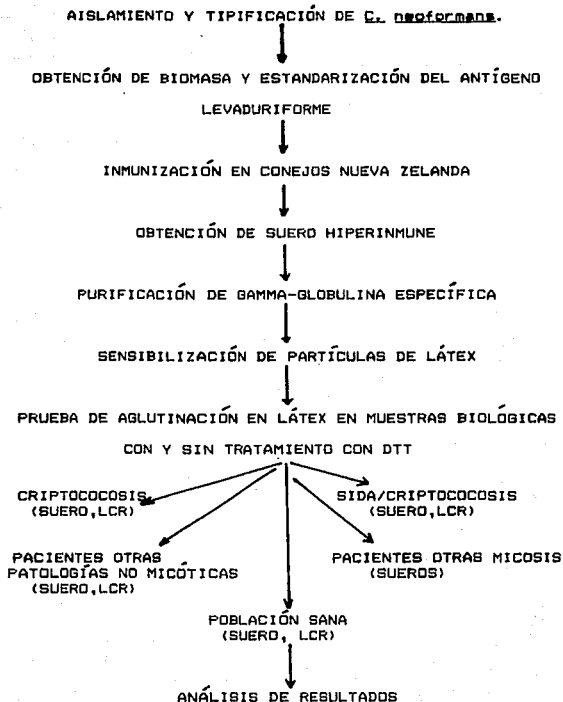
A) Aislar y tipificar bioquímicamente diferentes cepas de C. neoformans.

B) Seleccionar la cepa adecuada para elaborar los reactivos de la prueba de aglutinación en látex.

C) Obtener los reactivos para la prueba de aglutinación en látex para el diagnóstico de la criptococosis.

D) Probar la eficiencia de estos reactivos en la prueba de aglutinación en látex en fluidos corporales (suero y LCR) de cinco grupos de individuos con:

- 1) criptococosis
- 2) SIDA y criptococosis
- 3) otras micosis
- 4) otras patologías no micóticas y
- 5) grupo testigo de individuos sanos.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

MATERIALES Y METODOS

1) Hongos:

Las cepas EH-169, EH-170 y EH-171 de Cryptococcus neoformans, fueron aisladas de pacientes con criptococosis. Se mantuvieron en agar de dextrosa 2% y peptona 1% Sabouraud (Anexo 1) a 26°C. El hongo se identificó por medio de sus características micro y macroscópicas en diferentes medios de cultivo (Anexo 1) como son: Agar dextrosa Sabouraud, agar alpiste negro, en el cual produce un pigmento color marrón; agar nitritos, medio que contiene KNO_3 en el cual el hongo se distingue por no reducir este sustrato a nitritos. Además de los diferentes medios de cultivo, se realizaron las pruebas de crecimiento a 37°C, patogenicidad en el ratón, auxanograma y determinación de ureasa en la cual el desarrollo de un color fucsia indica prueba positiva para C. neoformans (Anexo 1). La variedad de las cepas se realizó por medio del agar glicina rojo de fenol (Anexo 1) en el cual la variedad gattii produce un cambio de color del rojo al amarillo (71,93).

2) Curva de crecimiento:

Para determinar la fase logarítmica de crecimiento de C. neoformans para la obtención del antígeno, se realizó una curva de crecimiento (2,82). Se preparó un precultivo con medio dializado de neopeptona y extracto de levadura (Anexo 1) en matraces de 250 ml conteniendo 80 ml de medio. Se inoculó con 1×10^6 cel/ml y se incubó a 37°C en agitación por tres días. Al cabo de este tiempo se cosecharon las células, las cuales fueron lavadas y utilizadas a una concentración de 1×10^6 cel/ml para inocular matraces de un litro conteniendo 200 ml del mismo medio. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación y se tomaron muestras diarias durante 7 días. Las muestras se centrifugaron y al sobrenadante se le determinó glucosa por el método de la o-toluidina (Anexo 1). La curva de crecimiento se realizó por triplicado.

3) Obtención del antígeno

Se tuvieron 5 distintas fuentes de obtención del antígeno del hongo para la preparación del suero hiperinmune anti-C. neoformans de conejo.

- a) Células completas levaduriformes muertas por timerosal.
- b) Células secas con acetona.
- c) Antígeno extraído con urea.
- d) Células completas muertas por calentamiento.

e) Antígeno polisacárido soluble.

Todos los antígenos fueron cosechados en la fase logarítmica de crecimiento.

a) Células completas levaduriformes muertas por timerosal (43,46,76):

Se inocularon 1×10^6 cel/ml de C. neoformans en matraces de un litro en caldo de dextrosa Sabouraud (Anexo 1), y se incubaron a 37°C durante 72 h en agitación. Se agregó timerosal a una concentración final de 0.02% durante 24 h a 4°C y se realizaron pruebas de esterilidad y viabilidad. Las células fueron lavadas con solución salina y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml. Esta suspensión se almacenó en alícuotas en viales estériles y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

b) Células secas con acetona (67):

Para la obtención de este antígeno, se siguió el mismo procedimiento anterior. El paquete celular obtenido se lavó 4 veces con acetona anhidra fría, se mantuvo en desecador y el polvo resultante se almacenó a 4°C hasta su utilización.

c) antígeno extraído con urea:

La obtención de este antígeno se realizó de acuerdo a la técnica de Bennett (8). Se inocularon 1×10^6 cel/ml del hongo en caldo dextrosa Sabouraud y se incubaron a 37°C por 72 h en agitación. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con solución salina. El paquete celular se mezcló con urea 11.6 M estéril en proporción de 1 ml de urea por 1 g de peso húmedo celular. La mezcla se mantuvo por 72 h a 4°C en agitación. El sobrenadante fue separado del paquete celular por centrifugación, el cual se dializó contra solución salina isotónica estéril durante 72 h. El extracto dializado se filtró en condiciones estériles. Se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry *et al* (66) y carbohidratos por Dubois *et al* (28). Este antígeno se empleó como refuerzo durante la inmunización de los conejos.

d) Células muertas por calentamiento:

Para la obtención de este antígeno se siguió el mismo procedimiento que en (a). El matraz con las células se llevó a ebullición durante 2 hrs según el procedimiento de Dolan (24,47). Inmediatamente después se centrifugaron y se lavaron las células con solución salina estéril. Las células se almacenaron en viales a 4°C , hasta su utilización.

e) antígeno polisacarídico soluble:

La obtención de este antígeno se realizó siguiendo el procedimiento de Evans y Theriault (35,40,73,74) con el filtrado del cultivo de las levaduras, preparadas de igual manera que para el primer antígeno. Se separaron las células del filtrado, y a éste se le agregó etanol al 96% (4.5 volúmenes de etanol por cada volumen de filtrado, con 0.1% de acetato de sodio). Se mantuvo 24 h a 4°C, y se centrifugó para obtener el precipitado, el cual se disolvió en la mínima cantidad de agua necesaria. Este procedimiento se repitió 3 veces. Después de determinar la ausencia de proteína por el método de Lowry, el precipitado se secó con acetona anhidra fría durante 24 h y se conservó a 4°C. Este antígeno se utilizó como control positivo para la prueba de aglutinación en látex ajustado a una concentración de 10 µg de polisacárido /ml (6,4).

4) Obtención de suero hiperinmune anti-Cryptococcus neoformans de conejo:

Para obtener el suero hiperinmune de conejo, se practicaron los siguientes esquemas de inmunización:

a) Esquema de Harrell et al. (42). Se inocularon conejos Nueva Zelanda con células completas levaduriformes muertas por medio de tratamiento con timerosal al 0.02%, por vía intravenosa, diariamente por cinco días seguidos durante

tres semanas.

b) Esquema de Dolan et al. (24,47). Los conejos se inocularon con el antígeno de células muertas por calentamiento vía intravenosa cada tres días durante cuatro semanas.

c) Esquema practicado con células secas con acetona (67). Se utilizó como antígeno células secas con acetona administradas al conejo por vía intravenosa cada tres días durante tres semanas.

d) Esquema de Dolan et al., modificado de la siguiente manera. Se utilizó como antígeno, células muertas por calentamiento mezcladas con adyuvante completo de Freund (3), inoculadas al conejo por vía subcutánea cada semana durante cuatro semanas. Después se continuó con el esquema de inmunización vía intravenosa de la misma forma que en b).

Los animales se sangraron 1 semana después del final del esquema de sensibilización y en el suero se determinó el título de anticuerpos, por medio de aglutinación en tubo (37,42,81) utilizando como antígeno células muertas por timerosal (antígeno 1). La prueba se realizó mezclando 0.5 ml de antisuero en diluciones seriadas dobles con 0.5 ml de antígeno ajustado al tubo # 2 de McFarland (6×10^6 cel/ml).

La prueba se leyó 2 h después de incubación a 37°C y a las 24 h a 4°C . Cuando los títulos dieron $>1:640$ los

conejos se sangraron a blanco, se separó el suero y se guardó en alícuotas a -45°C hasta su utilización.

5) Purificación de la fracción Gamma-globulinas:

Para obtener las inmunoglobulinas específicas del suero hiperinmune de conejo, se siguió la técnica descrita por Hudson & Hay (45). Se preparó una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/ml) a 50°C y se ajustó el pH a 7.2 con H_2SO_4 . El suero hiperinmune de conejo se diluyó 1:2 con solución salina y se añadió lentamente la solución saturada de sulfato de amonio a una concentración de 45% (v/v). Se mantuvo en agitación durante 30 min., y luego se centrifugó a 1000 g por 15 minutos a 4°C . El precipitado se volvió a lavar con solución saturada de amonio por centrifugación, y el sedimento resultante se redisolvió en un volumen igual al del suero original con solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (Anexo 1), esta solución se centrifugó para remover el material insoluble. Se reprecipitó la gamma-globulina usando una concentración final de 40% de solución de sulfato de amonio. Se lavó por centrifugación y el sedimento se disolvió en la mínima cantidad de SAF. Se dializó la gamma-globulina contra 5 cambios de SAF a 4°C . Se centrifugó y desechó el precipitado. La solución de gamma-globulina se ajustó a 40 mg proteína/ml y se almacenó a -45°C hasta su uso.

6) Sensibilización de las partículas de látex:

Se ensayaron dos métodos, uno según la técnica de Harrell *et al.* (42) y otro según Hudson y Hay (45). En la primera se hizo por separado una suspensión estándar de partículas de látex de diámetro 0.80 μm (Bigaux), y de 0.81 μm de fabricación nacional, en agua destilada cuya dilución 1:100 correspondió a una D₅₀ de 0.29-0.30 a 650 nm. La sensibilización de las partículas de látex se desarrolló de la siguiente manera: Se prepararon diluciones seriadas dobles de la fracción de gamma-globulina anti-C. neoformans, desde 1:100 hasta 1:1600 con solución amortiguadora de salina-glicina pH 9.0 (Anexo 1). Se agregó un volumen de la suspensión de partículas de látex estandarizada anteriormente a un volumen de cada dilución de gamma-globulina anti-C. neoformans. Se mezclaron y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Este correspondió al reactivo de látex gamma-globulina anti-C. neoformans (LACN) ó reactivo positivo. El reactivo negativo consistió de una suspensión de partículas de látex sensibilizadas con gamma-globulina normal de conejo (LGBN) (preparado por el mismo procedimiento del testigo positivo).

En la segunda técnica, de la suspensión original de partículas de látex de 0.81 μm al 30% se preparó una suspensión al 10%. De ésta se tomaron 800 μl y se lavaron dos veces con 40 ml de solución amortiguadora de glicina-

salina 0.054 M pH 8.2 (Anexo 1). Se mezclaron y centrifugaron a 12,500 g a 4°C durante 15 minutos. Se resuspendió el precipitado de látex en 20 ml de la solución amortiguadora de glicina-salina y se agregaron 300 µl de la gamma-globulina hiperinmune anti-C. neoformans. Este será el reactivo LACN. La suspensión se mezcló durante 30 minutos a temperatura ambiente. A diferencia de la técnica anterior se lavó la suspensión de LACN con 40 ml de la solución amortiguadora de glicina-salina, se mezcló y se centrifugó a 12,500 g a 4°C por 15 minutos. Se resuspendió el LACN en 20 ml de solución amortiguadora de glicina-salina 0.27 M pH 8.2 (Anexo 1), agregando albúmina sérica bovina al 0.1% para bloquear posibles sitios libres en el látex. Siguiendo el procedimiento anterior se preparó el testigo negativo (LGGN). Ambos se almacenaron a 4°C hasta su uso.

7) Determinación de la máxima dilución reactiva de la suspensión de partículas de látex sensibilizadas con gamma-globulina anti-C. neoformans (LACN).

La máxima dilución reactiva de la fracción de gamma-globulina anti-C. neoformans según Harrell *et al.* (42), se determinó probando cada dilución de una muestra (suero ó LCR) de referencia positiva proveniente de un paciente con criptococosis contra cada preparación de partículas de látex sensibilizadas con gamma-globulina anti-C. neoformans (LACN) preparadas con anterioridad. Las diluciones seriadas dobles

de suero y LCR de referencia se realizaron con la misma solución amortiguadora de fosfatos (SAF), y albúmina sérica bovina al 0.1 % (Anexo 1) para bloquear posibles sitios libres en el látex.

En una placa de vidrio oscura marcada con 10 círculos, se agregó a cada uno 0.02 ml de la suspensión de LACN de concentración 1:100, en seguida se agregaron 0.02 ml de la dilución respectiva del suero de referencia positivo a criptococosis (1:2-1:1024) a cada una de las gotas de la suspensión de LACN colocadas en la placa de vidrio. Se mezclaron y agitaron por 10 minutos a 100 rpm en un agitador rotatorio (Rotator Eberbach Corporation 115 AC). Este procedimiento se repitió con cada una de las siguientes diluciones de las suspensiones de LACN (1:200 a 1:1600). Se observó la aglutinación y los resultados se registraron desde 0-1+ como negativo y de 2+ hasta 4+ como positivo. Se tomó como la dilución máxima reactiva la suspensión del reactivo LACN que aglutinó con la dilución más alta del suero de referencia. El reactivo se almacenó a 4-6°C.

Para encontrar la dilución máxima reactiva del LACN siguiendo el procedimiento de Hudson y Hay (45), se prepararon suspensiones de LACN concentrado y diluido 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5 y diluciones seriadas dobles (1:2-1:128) de suero y LCR de referencia con amortiguador de glicina-salina 0.27 M, pH 8.2. Sobre una placa de vidrio oscura se

agregaron por separado 25 μ l de cada una de las diluciones anteriores del suero de referencia, y a cada dilución se le agregaron 25 μ l del LACN concentrado. Se agitó la placa durante 10 minutos en un agitador (Rotator Eberbach Corporation 115 AC) y se leyó la dilución máxima reactiva. Este procedimiento se repitió para cada una de las diferentes concentraciones (1:2-1:5) de las suspensiones de LACN. En ambos métodos el LGGN se ajustó a la misma dilución reactiva que presentó el LACN.

B) Muestras biológicas utilizadas en la Prueba de Aglutinación en Látex (PAL).

Se utilizó suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de cuatro grupos de pacientes y suero de un grupo de individuos sanos. El primer grupo comprendió 8 pacientes con criptococosis; el segundo de 8 pacientes con SIDA y criptococosis; el tercero de 4 pacientes con otras micosis, en las cuales se incluyeron un suero de un caso de candidosis sistémica, un LCR de un caso de aspergilosis y dos sueros mas de un caso de histoplasmosis y paracoccidioidomicosis respectivamente; y el cuarto que incluyó 16 pacientes con diversas patologías no micóticas. El grupo testigo comprendió 9 individuos sanos que donaron voluntariamente sangre de la cual se obtuvo el suero para la PAL (Tabla 3).

9) Desarrollo de la prueba para determinación del antígeno polisacárido en las muestras biológicas.

La detección del antígeno polisacárido de C. neoformans en sueros y LCR mediante la prueba de aglutinación en látex (PAL) con los reactivos LACN y LGGN correspondientes a la máxima dilución reactiva determinada anteriormente, se realizó por dos metodologías distintas: Por el método de Harrell et al. (42,81) y por la técnica de Hudson & Hay (45). Las muestras de suero fueron inactivadas a 56°C durante 30 minutos y las de LCR a 100°C durante 5 minutos. Las muestras problema se diluyeron desde 1:2 hasta 1:64, usando como diluyente solución amortiguadora de glicina-salina pH 9.0 (Anexo 1).

Primero, según el método de Harrell et al. (42), sobre una placa oscura marcada con 6 círculos, se colocaron de forma individual 0.04 ml de cada dilución de la muestra problema, más 0.02 ml del reactivo LACN en todos los círculos, y en otra placa con las mismas características se colocaron 0.04 ml de cada dilución de muestra, más 0.02 ml del reactivo LGGN.

Para el método de Hudson & Hay, se colocaron cantidades iguales de reactivo LACN y muestra problema diluida (0.04 ml más 0.04 ml respectivamente), lo mismo para probar la muestra con el reactivo LGGN. Con la ayuda de un aplicador se mezclaron los reactivos y las muestras. Las placas se

agitaron a 125 rpm durante cinco minutos y se leyeron las reacciones. Aquellas que presentaron una aglutinación de 0 a 1+ se consideraron negativas, aquellas que presentaron una aglutinación de 2+ a 4+ se consideraron positivas. El reactivo LGGN es el reactivo testigo, debido a que contiene inmunoglobulinas normales de conejo, por lo tanto el resultado debe ser siempre negativo.

A las muestras problema se les determinó al mismo tiempo la presencia de factor reumatoide (FR) (Laboratorios Licon, México) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, ya que hay antecedentes de reacciones falsas positivas cuando existe FR en las muestras biológicas (6,10,30,43). Aquellas muestras que presentaron factor reumatoide positivo se les realizó un tratamiento con Ditiotreitól (DTT) para eliminarlo (36,99). Este consistió en adicionar una solución de DTT 0.003 M en amortiguador tris-HCl al 0.2 M pH 8.6 (Anexo 1), a volúmenes iguales de la muestra inactivada por calentamiento durante 1 h a temperatura ambiente. Después de este tratamiento se determinó nuevamente la presencia del antígeno criptocócico.

RESULTADOS

Las tres cepas EH-169, EH 170 y EH 171 aisladas de pacientes crecieron a 28°C y a 37°C y presentaron la morfología macroscópica característica del hongo que consistió de colonias mucoides, convexas, limitadas, de color blanco a beige en los medios de agar dextrosa Sabouraud (ADS) y agar de infusión cerebro-corazón (BHI) (Figura 1). Además mostraron un pigmento café-marrón en el medio de agar alpiste negro (Quizotia abyssinica) (Figura 2).

La observación microscópica por la técnica de tinta China reveló levaduras en gemación rodeadas de una pequeña cápsula, en las cepas EH-169 y EH-171, sin embargo en la cepa EH-170 se observa una cápsula de diámetro mayor (Figura 3). Utilizando la técnica con fucsina básica (Ziehl-Neelsen) se observaron levaduras de color rosa con las mismas características anteriores.

Las cepas EH-169, EH-170 y EH-171 fueron clasificadas como C. neoformans con base en su crecimiento a 37°C, pigmento en agar alpiste negro, positividad a la prueba de ureasa, a la no reducción de NO_3 (Tabla 1) y de acuerdo a su patrón de asimilación de carbohidratos (sacarosa, inositol, maltosa, dextrosa, ribosa, xilosa, manosa, manitol, fructosa y lactosa) (Tabla 2). En la tabla 1 se muestra que las 3

cepas aisladas no asimilaron lactosa ni nitratos y fueron ureasa positivas.

La variedad de las cepas estudiadas se determinó en agar glicina-rojo de fenol (66,71), mostrando las tres cepas la variedad neoformans, de acuerdo al color rojo del medio.

Al probar la virulencia de las tres cepas en ratones correspondientes a cada una, los ratones inoculados con la cepa EH-170 capsulada murieron en una semana, y los inoculados con las otras dos cepas (EH-169 y EH-171) algunos murieron en una semana y los que continuaban vivos se sacrificaron. La necropsia correspondiente de tejido cerebral reveló la presencia del hongo capsulado en gemación, con las técnicas de hematoxilina y eosina (H&E) y tinción con tinta China. El cultivo de tejido cerebral en ADS presentó a los siete días colonias cuyas características se describieron anteriormente.

Se escogió la cepa de Cryptococcus neoformans EH-169 aislada de un paciente con criptococosis meníngea y SIDA, por presentar una cápsula pequeña que favorece una mejor obtención del suero hiperinmune. La cepa fue conservada en ADS a 4°C.

Todas las células levaduriformes utilizadas para preparar los diferentes antígenos de inmunización, se cosecharon al final de la fase logarítmica de crecimiento, la cual se obtuvo a los 4 días de incubación como puede

observarse en la figura 4.

De los cuatro diferentes esquemas de inmunización practicados se obtuvo la mejor respuesta de anticuerpos con el esquema de Harrell *et al.* (42), y con el esquema de Dolan *et al.* (24). La prueba de aglutinación en tubo de los sueros hiperinmunes obtenidos con estos esquemas detectó títulos de anticuerpos anti-*C. neoformans* hasta la dilución de 1:1024. La gamma-globulina anti-*C. neoformans* purificada reveló títulos de 1:1280 por la técnica de ELISA. Con el esquema de inmunización utilizando células secas con acetona se obtuvo un título de 1:32 y con el esquema de Dolan modificado (ver Materiales y Métodos) el título observado fue de 1:512.

De los dos tipos de partículas de látex utilizados para preparar los reactivos LACN y LG6N, las partículas de 0.80 μ m de Bigaux presentaron una mayor estabilidad. Las partículas de látex de diámetro de 0.81 μ m de fabricación nacional presentaron problemas de inestabilidad coloidal resultando en una autoaglutinación. Por lo tanto, se procedió a realizar la prueba con las partículas del laboratorio Bigaux.

Los datos de los pacientes estudiados se muestran en la tabla 3. El 64.5 por ciento corresponde al sexo masculino y el 35.5 al femenino. Las edades fluctuaron entre 25-48 años. Todos los pacientes con criptococosis así como los

testigos con otras micosis fueron diagnosticados por examen directo y cultivo. Se estudiaron 5 muestras de suero y 15 de LCR, provenientes de pacientes con criptococosis y dentro del grupo testigo se estudiaron 15 muestras de suero y 15 de LCR.

Se probó la máxima reactividad de las suspensiones de látex sensibilizadas por medio de dos métodos: Harrell et al (42) y Hudson & Hay (45), cuyas diferencias fundamentales fueron las siguientes: La preparación de los reactivos LACN y LGGN, la cantidad de partículas de látex y el lavado previo de las partículas de látex, además de utilización de albúmina sérica bovina para el bloqueo de los sitios libres (ver Materiales y Métodos). Se observó la mejor aglutinación con el suero de referencia por el método de Harrell et al., el cual presentó aglutinación de 4+ en una dilución de 1:8 del suero positivo de referencia a una concentración de 1:100 del reactivo LACN. La misma dilución del suero (1:8) presentó igualmente 4+ cuando se utilizó el LACN a 1:400 y 1:800 (Tabla 4). Al utilizar LCR de referencia de un paciente con criptococosis se observó la misma reactividad que con el suero de referencia (Tabla 5).

Con el procedimiento de Hudson & Hay se observó una reactividad de sólo 3+ con el reactivo concentrado desde una dilución 1:2-1:32 del suero de referencia, y la reactividad fue disminuyendo con respecto a las menores concentraciones

del reactivo LACN (Tabla 6). En la tabla 7 observamos que la máxima reactividad en el LCR de referencia, se obtiene también a una dilución 1:32 con el reactivo LACN concentrado, y una aglutinación menor con la concentración 1:2 del LACN. Sin embargo, la reactividad con las siguientes concentraciones se pierde y la mayoría de las diluciones del LCR de referencia se mostraron negativas.

Ha sido ampliamente demostrado que la mayoría de las reacciones falsas positivas son debidas a la presencia del factor reumatoide en el suero (6,36,37,99). Por lo tanto todas las muestras de suero y LCR fueron valoradas para este factor según lo descrito en material y métodos. Aquellas muestras positivas fueron tratadas con DTT según lo recomendado por Gordon et al (36), para descartar las reacciones falsas positivas.

Para interpretar correctamente los resultados de la PAL, es necesario incluir los reactivos LGGN, y un testigo positivo constituido de polisacárido criptococal ajustado a una concentración de 10 μ g /ml. De esta forma se cuenta con un patrón comparativo y entonces se considera como positivas aquellas reacciones que muestren una aglutinación igual o más fuerte que el testigo positivo, y/o aquellas muestras que presenten aglutinación cuatro veces mas alta con el reactivo LACN comparándola con el reactivo LGGN (85).

La PAL y la prueba de factor reumatoide en el suero de

cinco pacientes y las muestras testigo de polisacárido fúngico, antes del tratamiento con DTT, se muestran en la tabla 8. El FR resultó positivo para un suero de cinco ensayados. La PAL según Harrell et al., mostró positividad en todos los sueros utilizados provenientes de pacientes con criptococosis a una concentración 1:100 del LACN y a diluciones de las muestras de suero de 1:8 a 1:32. A una concentración 1:400 del LACN, se observó aglutinación menos evidente que la observada a una concentración 1:100 y las diluciones de los sueros problema van desde 1:4 hasta 1:64. El mismo comportamiento observado con la concentración 1:400 del LACN lo siguió la de 1:800, a excepción de un suero (6-SHR), en el cual el reactivo LACN de concentración 1:800 no aglutinó, pero sí hay aglutinación inespecífica con el reactivo LGGN, tanto en 1:800 como en la concentración de 1:100. Este suero resultó positivo al FR. Con la metodología de Hudson & Hay todos los sueros probados mostraron aglutinación de 2+ con el reactivo LACN concentrado y la reactividad en las muestras de suero van desde 1:4 hasta 1:64, como se muestra en la misma tabla 8. El reactivo LGGN no mostró reactividad para ninguna muestra de suero, ni para aquella que resultó positiva al FR. Las muestras de polisacárido de C. neoformans y el filtrado de cultivo utilizados como testigos positivos, por el método de Harrell et al., dieron positividad con el reactivo LACN a

concentración de 1:100 de 4+ y de 3+ respectivamente; para las concentraciones de 1:400 y 1:800 se observó aglutinación de 2+ para el polisacárido y negativo para el filtrado de cultivo. El reactivo LGGN no presentó aglutinación inespecífica a ninguna concentración. Por el método de Hudson & Hay la reactividad que se observó fue de 2+ para ambas muestras testigo (polisacárido y filtrado de cultivo), con el reactivo LACN y negativo para el LGGN.

En la tabla 9 se muestran los resultados de la PAL y FR para las muestras de LCR de 15 pacientes con criptococosis, antes del tratamiento con DTT. Por el método de Harrell et al., todas las muestras resultaron positivas con el reactivo LACN a una concentración de 1:100 y a diluciones del LCR desde 1:8 hasta 1:64. Para la concentración de 1:400 del LACN se observó una aglutinación de 3+ a diluciones de LCR que van desde 1:2 a 1:16 y con las diluciones 1:64 la aglutinación disminuye hasta 2+. Así mismo se observaron 2 casos negativos (6-SHR,7-OSO). Con la concentración de 1:800 del LACN se observa aglutinación de 2+ a 3+, a diluciones de LCR de 1:4 a 1:64 así como los mismos casos negativos (6-SHR,7-OSO). En todas estas muestras el reactivo LGGN no presentó reactividad inespecífica a ninguna concentración y con ninguna dilución de las muestras de LCR. Dos pacientes (10-GAJ,16-IPN) presentaron FR positivo. Siguiendo el método de Hudson & Hay se observó una

aglutinación de 3+ con el reactivo de LACN con títulos de 1:16 y 1:64 para dos muestras (5-VRT,15-VRS) y de 2+ a diluciones del LCR que van desde 1:8 hasta 1:64. No se observaron reacciones positivas al reactivo LGBN.

Los resultados que nos muestra la tabla 10 refieren la PAL en muestras con otras micosis, como candidosis, aspergilosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis. Todas las muestras tanto suero como LCR permanecen negativas a los reactivos LACN y LGBN tanto en el procedimiento de Harrell *et al.*, como para el de Hudson & Hay.

En la tabla 11 observamos los resultados de la PAL con las muestras de pacientes con otras patologías no micóticas. Con el método de Harrell *et al.* aquellas muestras que resultaron negativas al FR, también lo fueron con el reactivo de LACN y LGBN en todas sus concentraciones y para todas las diluciones de las muestras probadas. Las muestras con FR positivo (21-TCE,22-RPD,31-CPF,33-LDD,34-AAD) mostraron falsos positivos con el reactivo LACN y aglutinación inespecífica con el LGBN y un caso con FR negativo (36-GPD) presentó aglutinación inespecífica de 2+ a concentraciones 1:400 y 1:800 del LACN. Con el procedimiento de Hudson & Hay las mismas muestras con FR positivo (21-TCE,22-RPD,31-CPF,33-LDD,34-AAD) dieron falsos positivos y aglutinación inespecífica. Sin embargo en un caso (35-HVA) con FR negativo a diferencia del método de

Harrell et al., presentó una positividad de 2+ con ambos reactivos (LACN y LGGN).

Los resultados de la FAL con sueros normales se muestran en la tabla 12. Todas las muestras de suero con FR negativo presentaron la prueba negativa en todas las diluciones probadas, con ambos reactivos (LACN y LGGN) así como con ambos métodos. De las tres muestras (39-PML, 43-JLM, 44-FRD) positivas al FR sólo dos de ellas (39-PML, 44-FRD), presentaron aglutinación inespecífica en ambos métodos ensayados, uno (43-JLM) permaneció negativo a la prueba independientemente de los reactivos y métodos utilizados. La muestra 39-PML presentó positividad únicamente con el reactivo LACN del método de Hudson & Hay. Por último la muestra 44-FRD presentó positividad tanto con el reactivo LACN como LGGN en ambos métodos ensayados.

El resultado de las muestras de suero y LCR que dieron positivas para el FR, fueron tratadas con DTT para eliminar las falsas positivas y se muestran en las tablas 13 y 14 respectivamente. La interferencia dada por el factor reumatoide se eliminó completamente y sólo permanecieron positivas aquellas procedentes de pacientes con criptococosis confirmada por cultivo (7-OSD, 10-GAJ), al utilizar ambos métodos. El reactivo LACN mostró la mayor aglutinación con la concentración de 1:100. El reactivo LGGN no mostró aglutinación inespecífica.

DISCUSION

El estudio de la virulencia y patogenicidad de C. neoformans ha sido investigado ampliamente por Kwon-Chung et al. (60,61), utilizando métodos genéticos bien definidos. Identificaron tres factores de virulencia para este hongo: su crecimiento a 37°C, su cápsula de mucopolisacárido y una fenol oxidasa activa que sintetiza melanina a partir de los precursores apropiados.

Aparte de los métodos convencionales de identificación de C. neoformans como presencia de cápsula, virulencia en el ratón y pruebas bioquímicas, se utilizó el medio de Staib conteniendo semillas de Guizotia abyssinica, que contiene compuestos fenólicos, como el ácido cafeínico, para poner en evidencia la fenol oxidasa del hongo. El resultado mostró que las cepas utilizadas fueron capaces de transformarse de colonias cremosas a café oscuro, indicando indirectamente la presencia de la fenol oxidasa en las cepas estudiadas. En este hongo se demostró la asociación de este producto con la virulencia del mismo, a partir de un modelo murino experimental realizado con mutantes deficientes en melanina y la cepa silvestre de Cryptococcus neoformans (31,47,60-64,85,88).

Se utilizó la cepa EH-169 con poca cápsula para el esquema de inmunización debido a que diversos trabajos

37
(446,57,58,68), indican títulos bajos de anticuerpos en conejos con las cepas capsuladas. Esto se debe entre otros factores a que la cápsula de Cryptococcus, compuesta de dos fracciones polisacáridicas: manosa, xilosa y ácido glucurónico (GXM), y galactosa, xilosa y manosa (GalXM) es un fuerte inhibidor de la fagocitosis (57,59,60,65,76,79), paso crucial para llevar a cabo la presentación de un antígeno. La cepa EH-170 que presentó una cápsula grande se utilizó para producir el antígeno polisacáridico soluble que fue utilizado como testigo positivo de referencia (35,40).

El antígeno se obtuvo al final de la fase logarítmica de crecimiento, ya que estudios con otros hongos patógenos como Sporothrix schenckii y Aspergillus fumigatus mostraron que la mayor reactividad inmunogénica y reproducibilidad del antígeno se obtenían en esta fase (2,82).

Durante la preparación de los reactivos para el desarrollo de la prueba de aglutinación en látex, se presentaron varios problemas. Uno de ellos fue la obtención del suero hiperinmune debido a que en su mayoría la composición química de la cápsula de este hongo está formada por polisacáridos por tanto resulta un pobre inmunógeno (3,42,46,57,59,65). Se ensayaron cuatro esquemas de inmunización, de los cuales los de Harrell et al. (42), y Dolan et al. (24), dieron los mejores resultados, siendo la diferencia entre los dos procedimientos la muerte del hongo,

uno con timerosal y el otro por calor respectivamente. Se siguió la recomendación de Dolan (24) de inmunizaciones múltiples intravenosas para la óptima obtención de títulos de anticuerpo.

Por otro lado la estabilidad de las partículas de látex de 0.81 μ m del laboratorio nacional se perdía poco después de preparar el reactivo LACN y LGGN, resultando en una autoaglutinación. Estas partículas de látex no presentaban un tamaño homogéneo. El lograr la estabilidad de las partículas de látex con albúmina sérica bovina, antes y después de su sensibilización, fue definitivo porque así se aseguró que los resultados fueran representativos. Para lograr la estabilidad de las partículas se tomaron en cuenta sus caracteres fisicoquímicos como el de ser una suspensión coloidal de partículas hidrofóbicas cargadas en su superficie. En presencia de pequeñas cantidades de proteína pierden su estabilidad y aglutinan, sin embargo al suspenderlas en una mayor cantidad de proteína la recuperan (6,24,81).

Es un hecho ampliamente estudiado que la presencia del factor reumatoide en fluidos corporales produce un resultado falso positivo en la PAL (6,10,30,36,39,43,99). La explicación de este fenómeno es que la macroglobulina presente en suero de pacientes con artritis reumatoide corresponde a una IgM, la cual reacciona con determinantes

antigénicos específicos de la cadena gamma de globulinas IgG. Se ha demostrado la habilidad de la IGM para aglutinar partículas de látex que han sido sensibilizadas con anticuerpos IgG, y en esta prueba mas del 90% de la gamma globulina anti-criptococal usada para sensibilizar partículas de látex consiste de IgG (6,36).

Además del factor reumatoide también se han aceptado factores que puedan interferir en la reacción tales como cruce antigénico con Trichosporum beigellii (70,83) y otras sustancias cuya naturaleza se desconoce (6,24). Estudios sobre estos factores de interferencia en la PAL (30,36,39,41,43) reportaron que compuestos sulfhidrilo como el mercaptoetanol, ditiotreitól (DTT), así como un tratamiento con EDTA (36,39,70) remueven estos factores sin afectar la cantidad presente de antígeno criptococal. Posiblemente el tratamiento con DTT rompe enlaces disulfuro, eliminando los factores responsables de las reacciones falsas positivas. Además del tratamiento con DTT, diversos autores (36,24,51,99) sugieren el procedimiento del calentamiento de las muestras de suero y LCR a 56°C durante 30 min antes de realizar la PAL, para eliminar las reacciones inespecíficas. Se desconoce la naturaleza de estos factores lábiles al calor.

Uno de los factores de virulencia de C. neoformans, la cápsula, lo protege de la defensa del hospedero produciendo

este en general una respuesta minima de anticuerpos en el hombre y los animales. Esto se debe probablemente a la composición quimica de la cápsula, ya que este microorganismo libera gran cantidad de polisacárido criptococal hacia los fluidos corporales evitando con ello se generen anticuerpos en su contra (58,72,76,77,78,88). En consecuencia, en esta micosis los procedimientos serológicos de diagnóstico estan enfocados a la detección del antígeno circulante en fluidos corporales, como la aglutinación de partículas de látex, prueba desarrollada en el presente estudio.

Entre diversos trabajos realizados con la PAL, Mackenzie (68) reportó en un estudio realizado con el filtrado de cultivo de 104 levaduras diferentes a C. neoformans, que esta prueba sólo aglutina con el filtrado de cultivo de este hongo. Además la encontró positiva para muestras de pacientes con infección criptococal. Bennett y Bailey (6) encontraron que después de analizar 252 muestras de LCR y suero, el 9.5% presentaba reacciones falsas positivas y que estas se debian en gran parte al factor reumatoide (FR). Por su parte Kauffman et al. (51), encontraron en la PAL una especificidad del 90% tanto en suero como en el LCR después de analizar un total de 335 muestras. Asznowicz et al. (4) en un estudio retrospectivo donde además de valorar la PAL, la compararon con las pruebas de diagnóstico de tinta China

y cultivo, encontraron que de 59 muestras, solo el 2% fue positivo para la tinta China y el 22% para cultivo, sin embargo el 91% de ellas presentaron la PAL positiva, concluyendo así la ventaja de esta última con respecto a los métodos de tinta China y cultivo. Sekhon *et al.* (90), realizaron una valoración de la PAL en Canada, mientras tanto Scholer HJ (92) en un estudio en muestras procedentes de diferentes partes del mundo (Europa, Asia, Africa) así como Desmet *et al.* (22) realizaron un trabajo similar en un área de Africa. En todos estos trabajos se llega a la conclusión de que la PAL es una de las pruebas de mayor utilidad para el diagnóstico de la criptococosis, y en caso de presentar fenómenos de reacciones inespecíficas dadas por factores interferentes entre ellos el FR, éstas ocurren en un 5-10%.

En el presente estudio de muestras (SUERO, LCR) de pacientes con criptococosis provenientes de hospitales mexicanos, se encontró que el 100% de éstas dieron un resultado positivo a la PAL, lo que mostró una alta sensibilidad de la prueba, por otro lado la misma prueba resultó negativa en muestras de pacientes con otras micosis y otras patologías mostrando así mismo gran especificidad con este reactivo para la detección de antígeno circulante de C. neoformans.

Los estudios de mayor relevancia con respecto a reacciones falsas positivas encontradas en la PAL están

realizados principalmente por Bennett et al. (6), Dolan et al. (24). Bennett et al. (6) recomendó el uso de controles tales como un reactivo de partículas de látex sensibilizadas con gamma globulina normal de conejo y un reactivo que consistió de polisacárido criptococal de 10 μ g de polisacárido/ml. Con el uso de estos controles la PAL comparada con otros procedimientos resulta mucho mas sensible y específica.

Por su parte Dolan et al. (24), en un estudio realizado con muestras de suero y LCR de pacientes con criptococosis, de otras infecciones micóticas, y otras con FR positivo así como un grupo de sueros de individuos sanos, encontró interferencias en muestras de pacientes con aspergilosis broncopulmonar y blastomycosis. En sueros con FR, el 87% de ellas aglutinaban con el reactivo de látex gamma globulina anti-criptococal (LACN) y el 38% aglutinaba con el reactivo látex gamma globulina normal de conejo (LGBN). Ninguna de las muestras de individuos sanos aglutinó los reactivos antes mencionados. Concluyó que una reacción positiva con el reactivo de látex gamma globulina anti-criptococal, combinada con un FR negativo y la no aglutinación del reactivo látex gamma globulina normal de conejo, es altamente significativa de una infección criptococal. En el presente estudio con el fin de eliminar las reacciones inespecíficas, se calentó el suero como lo recomendó Dolan,

eliminando con ello los resultados falsos positivos encontrados en un porcentaje del 27.2 del cual el 10% aglutinó el reactivo LACN y el 17.2 % aglutinó el LGGN. Se incluyó además un testigo positivo de polisacárido criptococal, reactivo de látex gamma globulina normal, y el tratamiento con DTT de las muestras analizadas, para obtener una especificidad y sensibilidad de un 100% en la PAL.

La prueba de aglutinación en látex desarrollada para la detección del antígeno criptococal demostró ser en las muestras de pacientes de hospitales mexicanos un procedimiento serológico de gran ayuda para el diagnóstico de la criptococosis por la sensibilidad y especificidad, con la inclusión de controles apropiados para detectar las reacciones inespecíficas.

CONCLUSIONES

1) La obtención de un suero hiperinmune con altos títulos de anticuerpos es fundamental para la sensibilización de las partículas de látex y la realización de la prueba de aglutinación.

2) Para la realización óptima de la prueba, las partículas de látex deben ser estrictamente de un tamaño homogéneo.

3) El tratamiento con DTT y calor es determinante para eliminar los factores interferentes en la prueba de aglutinación en látex para el antígeno criptococal y por lo tanto las reacciones falsas positivas.

4) La inclusión del reactivo de partículas de látex sensibilizado con inmunoglobulina de suero de conejo normal (LGBN) facilita la interpretación de reacciones falsas positivas durante la prueba de aglutinación en muestras de suero y LCR.

5) La PAL con los reactivos preparados en el presente estudio confirmó el diagnóstico clínico de criptococosis en muestras de sueros y LCR de los pacientes estudiados.

ANEXO I

1. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

a) Agar Dextrosa Peptona Sabouraud.

peptona	10.0 g
dextrosa	40.0 g
agar	15.0g
agua destilada	1000 ml

Se utilizó para el mantenimiento de cepas, y para pruebas de esterilidad.

b) Caldo Dextrosa Sabouraud.

peptona	10.0 g.	(Difco).
dextrosa	20.0 g.	(Merck).
agua destilada	1000 ml.	

Se utilizó para la obtención del antígeno levaduriforme, así como para la curva de crecimiento.

c) Agar Alpiste Negro. (Según Staib)

alpiste negro o niger.	50.0 g
cloramfenicol.	50.0 mg
agar bacteriológico.	15.0
glucosa	1.0
creatinina	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
agua dest.	1000 ml

Se utilizó como medio diferencial. La producción de un pigmento castaño rojizo marrón es característico de C. neoformans.

d) Agar Nitritos.

agar	20.0 g
KNO ₃	1.0 g
peptona de carne	2.0 g
agua dest.	1000 ml

Se utilizó como medio diferencial. C. neoformans no es capaz de utilizar como fuente de nitrógeno al KNO₃.

e) Agar Biggy-Nickerson.

citrato de bismuto amonico	5.0 g
sulfito de sodio	3.0 g
dextrosa	10.0 g
extracto de levadura	1.0 g
glicina	1.0 g
cloramfenicol	0.5 g
agar	20.0 g
agua dest.	1000 ml.

Se utilizó como un medio de referencia para otras especies. El desarrollo de pigmento marrón es característico de C. albicans.

f) Agar Glicina Rojo de Fenol.

Salkin y Hard los describen como medio diferencial de variedades. Con la var. gattii el medio produce un cambio de color del rojo al amarillo.

glicina	1.0 %
ciclohexamida	1.6 ml
rojo de fenol	0.0018 g
agar	15.0 g

Las placas son inoculadas abundantemente con el microorganismo y se incuban a 37°C, por lo menos una semana.

g) Dializado de Neopeptona y Levadura.

neopeptona	1.0 %	(Difco)
extracto de levadura	1.0 %	(Difco)
dextrosa	1.0 %	" (Merck)

Utilizado para la preparación de antígeno criptococal.

h) Amortiguador de Fosfatos.

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	2.9 g
KCl	0.2 g
agua dest.	1000 ml
pH=	7.2

i) Amortiguador de solución Glicina-Salina.

NaCl	9.0 g
CaCl ₂	1.0 g
glicina	7.5 g
agua dest.	1000 ml
pH=	9.0

Añadir 1 g de albúmina sérica bovina.

j) Amortiguador de Glicina-Salina 0.57 M pH 8.6.

Glicina	14.0
NaOH	0.7
NaCl	17.0
Azida de sodio (conservador)	1.0

Disolver en 500 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.6.

Aforar a 1000 ml.

k) Amortiguador Tris HCl 0.2 M

Tris-HCl	31.2 g
agua destilada	1000 ml

Se ajustar el pH de 8.6.

2) PRUEBAS BIOQUIMICAS

a) Asimilación de carbohidratos.

Se utilizó el caldo base para asimilación de carbohidratos.

tripteína BBL	10.0 g
NaCl	5.0 g
rojo de fenol	0.018g
agua dest.	1000 ml

El carbohidrato en estudio se añade al caldo ya

esterilizado, a una concentración de 0.5 -1 % esterilizado por filtración.

Se inocula el caldo con una asada del microorganismo previamente aislado en cultivo puro. Incubar a 37°C de 6-10 días. El desarrollo de un color amarillo estable, indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4.4 y es una prueba positiva.

b) Prueba de ureasa.

El caldo Urea de Christensen es uno de los medios más utilizados, para la detección de actividad de ureasa.

peptona	1.0 g
glucosa	1.0 g
NaCl	5.0 g
Fosfato monopotásico	2.0 g
urea	20.0 g
rojo de fenol	0.012g
pH= 6.8	

La misma que al inocular los carbohidratos.

El desarrollo de un color bugambilia, indica prueba positiva.

c) Prueba de Patogenicidad en el ratón.

Se hace una suspensión salina de células obtenidas de 4-5 días de crecimiento. Se recomienda una dilución 1:100.

Se inoculan 2-4 ratones via intracerebral con 0.02-0.03 ml de la suspensión de levaduras. Los ratones mueren entre 2-7 días. Se realiza una necropsia de los ratones que mueren o se sacrifican al cabo de 2 semanas. Se examina el material gelatinoso del cerebro en 1 gota de tinta china negra para observar la presencia de células levaduriformes.

d) Método de la o-toluidina.

Utilizado para la determinación de glucosa en el medio de cultivo para la curva de crecimiento.

o-toluidina	6.0 ml (Merck)
tiourea	0.15 g (Merck)
ac. acético glacial	100 ml.

Se agregan 3 ml de este reactivo por cada ml de sobrenadante centrifugado del medio de cultivo. La coloración resultante se leyó a 630 -635 nm. en el espectrofotómetro.

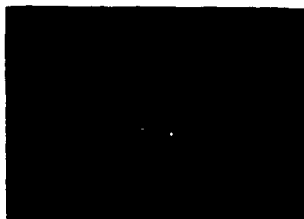


FIGURA 1. Cultivo de C. neoformans en Medio de agar Sabouraud donde presenta colonias blancas cremosas y mucoides.



FIGURA 2. Cultivo de C. neoformans en Medio de agar alpiste negro donde presenta colonias - oscuras café-marrón.

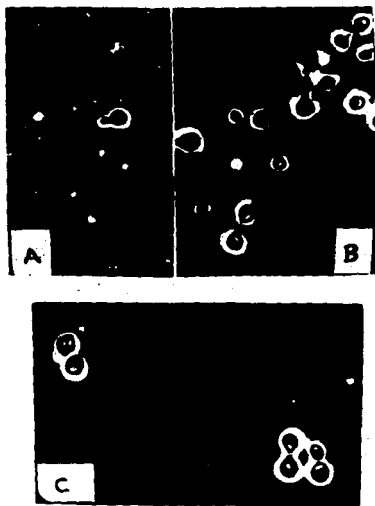


FIGURA 3. Cryptococcus neoformans. A) Cepa EH-169
B) Cepa EH-170 y C) Cepa EH-171. Tin -
ción con Tinta China. (1000X)

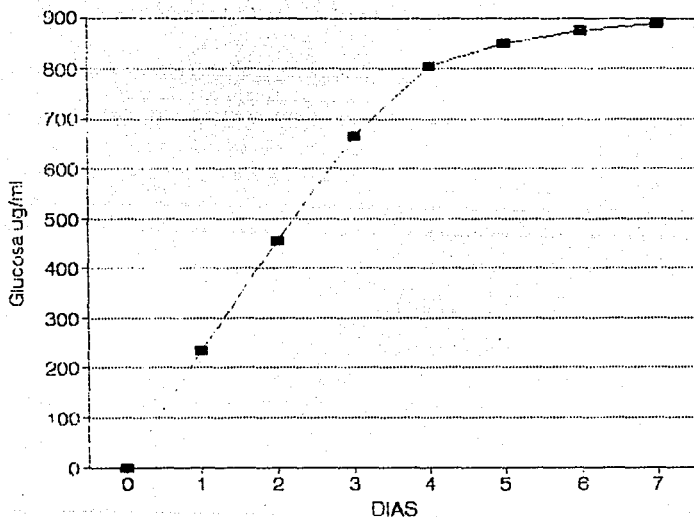


FIGURA 4. Curva de crecimiento de *Cryptococcus neoformans* EH-169 por medio de la determinación del consumo de glucosa. Cada punto es el promedio de tres experimentos distintos.

TABLA 1. Características de Cryptococcus neoformans.

CEPA	VIRULENCIA EN RATON	CRECIMIENTO A 37°C	PIGMENTO EN AGAR ALPISTE NEGR0	UREASA	KNO ₃
EH-169	+	+	+	+	-
EH-170	+	+	+	+	-
EH-171	+	+	+	+	-

TABLA 2. Asimilación de carbohidratos por Cryptococcus neoformans.

CEPA	SAC	LAC	MAL	MAN	DEX	RIB	XIL	INO	FRU	MANI
EH-169	+	-	+	+	+	+	+/ -	+	+	+/ -
EH-170	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
EH-171	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+/ -

SAC=sacarosa, LAC=lactosa, MAL=maltosa, MAN=manosa, DEX=dextrosa, RIB=ribosa,
XIL=xilosa, INO=inositol, FRU=fructosa, MANI=manitol.

(+)= Asimilación. (-)= No asimilación. (+/-)= Variable.

TABLA 3. Datos generales de la población de individuos de los cuales se obtuvieron muestras biológicas para la prueba de aglutinación en látex

Paciente	Sexo	Edad (años)	Diagnóstico Clínico(*)	Enfermedad asociada(*)	Muestra estudiada
1-ILE	M	35	SIDA	Criptococosis	Suero
2-BGM	F	28	SIDA	Criptococosis	LCR
3-RMS	M	32	SIDA	Criptococosis	LCR
4-JAR	M	27	SIDA	Criptococosis	LCR
5-VRT	F	36	SIDA	Criptococosis	LCR
6-SHR	M	28	SIDA	Criptococosis	Suero y LCR
7-OSO	M	27	SIDA	Criptococosis	Suero y LCR
8-FVB	M	32	SIDA	Criptococosis	Suero y LCR
9-MLE	M	48	Criptococosis cerebral	Ninguna	Suero y LCR
10-BAJ	M	27	Criptococosis	NC	LCR
11-OGAL	F	29	Criptococosis	NC	LCR
12-VBA	M	25	Criptococosis	NC	LCR
13-RVT	F	28	Criptococosis	NC	LCR
14-RJA	M	35	Criptococosis	NC	LCR
15-VRS	M	31	Criptococosis	NC	LCR
16-IPN	F	29	Criptococosis	NC	LCR

* El diagnóstico de la Criptococosis se confirmó por examen directo y cultivo.
 F= femenino M= masculino NC= no conocido

Tabla 3. (cont.)

Grupos Testigo					
Paciente	Sexo	Edad (años)	Diagnóstico Clínico(s)	Enfermedad asociada(s)	Muestra estudiada
17-DBR	F	NC	Candidosis	NC	Suero
18-SMJ	M	NC	Histoplasmosis	NC	Suero
19-DRA	M	NC	Paracoccidiodiomycosis	NC	Suero
20-NTI	M	NC	Aspergilosis	NC	LCR
21-TCE	M	29	BIDA	Neuroinfección	LCR
22-RPD	M	35	Neuroinfección	NC	LCR
23-LVA	M	32	SIDA	NC	LCR
24-ARN	F	35	Neuroinfección	NC	LCR
25-WPP	M	29	Neuroinfección	NC	LCR
26-FRMD	F	32	Neuroinfección	NC	LCR
27-GLMC	F	38	Abceso intracraneal	NC	LCR
28-AML	M	42	Infarto cerebral	NC	LCR
29-HAB	M	34	Neurocisticercosis	NC	LCR
30-BRE	M	45	Crisis convulsivas	NC	LCR
31-CPF	M	36	Neuroinfección	NC	LCR
32-MCO	M	27	SIDA	Toxoplasmosis	LCR
33-LDD	F	NC	Tétanos	NC	Suero
34-MAD	F	29	SIDA	Toxoplasmosis	LCR
35-HVA	F	37	Lupus Eritematoso Sistémico	NC	Suero
36-BPD	F	44	Neuroinfección	NC	LCR
37-RJY	M	25	Sano		Suero
38-JLV	M	24	Sano		Suero
39-PHL	M	26	Sano		Suero
40-DGH	M	28	Sano		Suero
41-IMN	F	25	Sano		Suero
42-DPS	F	25	Sano		Suero
43-JLM	F	26	Sano		Suero
44-FRD	M	24	Sano		Suero
45-PAB	M	22	Sano		Suero

F= femenino

M= masculino

NC= no conocido.

TABLA 4. Determinación de la máxima dilución reactiva de LACN por el método de Harrell et al (42) con el suero de referencia de un paciente con criptococosis

Diluciones del LACN	Diluciones del suero de referencia									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1:100	4+	4+	4+	3+	3+	3+	Neg	Neg	Neg	Neg
1:200	2+	2+	3+	3+	3+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1:400	3+	3+	4+	3+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1:800	3+	3+	4+	3+	3+	2+	Neg	Neg	Neg	Neg
1:1600	2+	2+	3+	3+	2+	2+	Neg	Neg	Neg	Neg

LACN = Látex gamma-globulina anti *C. neoformans*.

0 a 1+ = Negativo

2+ a 4+ = Positivo

TABLA 5 .Determinación de la máxima dilución reactiva de LACN por el método de Harrell *et al.* (42) con el LCR de referencia proveniente de un paciente con criptococosis

Diluciones del LACN	Diluciones del LCR de referencia									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
1:100	4+	4+	4+	3+	3+	3+	Neg	Neg	Neg	Neg
1:200	4+	3+	3+	3+	3+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1:400	3+	3+	4+	3+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1:800	3+	3+	4+	3+	3+	2+	Neg	Neg	Neg	Neg
1:1600	2+	2+	3+	3+	2+	2+	Neg	Neg	Neg	Neg

LACN = Látex gamma-globulina anti *C. neoformans*.

0 a 1+ = Negativo

2+ a 4+ = Positivo

LCR = Líquido cefalorraquídeo.

TABLA 6. Determinación de la máxima dilución reactiva de LACN por el método de Hudson & Hay (45) con el suero de referencia de un paciente con criptococosis

Diluciones del LACN	Concentración del suero de referencia						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Concentrado	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+
1:2	3+	3+	3+	2+	2+	2+	Neg
1:3	2+	2+	2+	2+	2+	Neg	Neg
1:4	2+	2+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1:5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

LACN = Latex gasea-globulina anti-C. neoformans

0 a 1+ Negativo

2+ a 4+ Positivo

TABLA 7. Determinación de la máxima dilución reactiva de LACN por el método de Hudson & Hay (45) con el LCR de referencia de un paciente con criptococosis

Diluciones del LACN	Concentración del LCR de referencia						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Concentrado	2+	3+	3+	3+	3+	2+	Neg
1:2	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+
1:3	Neg	2+	Neg	2+	Neg	Neg	Neg
1:4	Neg	2+	2+	2+	Neg	Neg	Neg
1:5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

LACN = Latex goma-globulina anti-*C. neoformans*

0 a 1+ = Negativo

2+ a 4+ = Positivo

LCR = Líquido cefalorraquídeo.

TABLA 8. Prueba de aglutinación en látex y factor reumatoide (FR) utilizando sueros positivos con criptococosis(*) y muestras testigo de polisacárido fúngico

Código	Diagnóstico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Hay	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Látex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACN	LGGN
			LACN	LGGN	LACN	LGGN	LACN	LGGN		
1-ILE	criptococosis y SIDA	neg	1:16 2+	neg	1:8 2+	neg	1:4 2+	neg	1:32 2+	neg
6-SHR	criptococosis y SIDA	pos	1:8 4+	1:8 2+	1:4 2+	neg	neg	1:32 2+	1:4 2+	neg
7-OSO	criptococosis y SIDA	neg	1:8 3+	neg	1:8 2+	neg	1:8 2+	neg	1:32 2+	neg
8-FVB	criptococosis y SIDA	neg	1:32 3+	neg	1:64 2+	neg	1:64 2+	neg	1:64 2+	neg
9-MLE	criptococosis cerebral	neg	1:8 4+	neg	1:8 2+	neg	1:8 2+	neg	1:16 2+	neg
	polisacárido de <i>C. neoformans</i> (**)	neg	1:16 4+	neg	1:8 2+	neg	1:8 2+	neg	1:8 2+	neg
	filtrado de cultivo de <i>C. neoformans</i> (**)	neg	1:32 3+	neg	neg	neg	neg	neg	1:4 3+	neg

* La criptococosis fue confirmada por examen directo y cultivo.

** Estos antígenos constituyeron el testigo positivo que se ajustó a 10 µg CHO/ml

LACN = Látex gamma-globulina anti *C. neoformans*.

LGGN = Látex gamma-globulina normal de conejo.

TABLA 9. Prueba de aglutinación en látex y factor reumatoide (FR) utilizando LCR positivos a criptococosis.

Codigo	Diagnóstico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Hay	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Látex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACN	LGBN
			LACN	LGBN	LACN	LGBN	LACN	LGBN		
2-GBH	criptococosis y SIDA	neg	1:32 3+	neg	1:4 3+	neg	1:4 3+	neg	1:32 2+	neg
3-RHS	criptococosis y SIDA	neg	1:64 3+	neg	1:64 2+	neg	neg	neg	1:2 2+	neg
4-JAR	criptococosis y SIDA	neg	1:16 3+	neg	1:16 2+	neg	1:8 3+	neg	1:32 2+	neg
5-VRT	criptococosis y SIDA	neg	1:8 4+	neg	1:8 3+	neg	1:8 2+	neg	1:16 2+	neg
6-SHR	criptococosis y SIDA	neg	1:32 2+	neg	neg	neg	neg	neg	1:32 2+	neg
7-OSO	criptococosis y SIDA	neg	1:16 2+	neg	neg	neg	neg	neg	1:8 2+	neg
8-FVB	criptococosis	neg	1:64 3+	neg	1:16 3+	neg	1:16 3+	neg	1:64 2+	neg
9-MLE	criptococoma cerebral	neg	1:32 3+	neg	1:4 3+	neg	1:4 3+	neg	1:8 2+	neg

LACN = Látex gamma-globulina anti- *C. neoformans*.

LGBN = Látex gamma-globulina normal de conejo.

TABLA 9. (cont.)

Código	Diagnóstico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Hay	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Látex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACN	LGBN
			LACN	LGBN	LACN	LGBN	LACN	LGBN		
10-BAJ	criptococosis	pos	1:16 3+	neg	1:16 3+	neg	1:8 3+	neg	1:32 2+	neg
11-DOAL	criptococosis	neg	1:32 2+	neg	neg	neg	neg	neg	1:32 2+	neg
12-VBA	criptococosis	neg	1:32 3+	neg	1:64 3+	neg	1:64 2+	neg	1:32 2+	neg
13-RVT	criptococosis	neg	1:8 3+	neg	1:16 2+	neg	1:16 2+	neg	1:16 2+	neg
14-RJA	criptococosis	neg	1:8 3+	neg	1:2 3+	neg	1:16 2+	neg	1:32 2+	neg
15-VRS	criptococosis	neg	1:64 3+	neg	1:64 2+	neg	1:64 3+	neg	1:64 3+	neg
16-IPW	criptococosis	pos	1:16 3+	neg	1:16 3+	neg	1:16 3+	neg	1:32 2+	neg

LACN= Látex gamma-globulina anti-*C. neoformans*.

LGBN= Látex gamma-globulina normal de conejo.

TABLA 10. Prueba de aglutinación en látex y factor reumatoide (FR) en muestras de LCR y suero de pacientes con otras micosis

Código	Diagnóstico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Hay	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Látex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACH	LGBN
			LACH	LGBN	LACH	LGBN	LACH	LGBN		
17-DBR	candidosis (suero)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
18-SNJ	histoplasmosis (suero)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
19-ORA	paracoccidio diomicosis (suero)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
20-MTI	aspergilosis (LCR)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

LACH= Látex gamma-globulina anti-*C. neoformans*.

LGBN= Látex gamma-globulina normal de conejo.

TABLA 11. Prueba de aglutinación en látex y factor reumatoide (FR) en muestras de pacientes con patologías no micóticas

Codigo	Diagnostico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Hay	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Látex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACN	LGBN
			LACN	LGBN	LACN	LGBN	LACN	LGBN		
21-TCE	SIDA	pos	1:64 2+	1:16 3+	1:2 4+	neg	neg	1:64 3+	1:16 4+	1:64 2+
22-RPD	neuroinfección	pos	1:4 2+	neg	neg	neg	neg	neg	1:4 3+	1:4 3+
23-LVA	SIDA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
24-ARM	neuroinfección	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
25-NPP	neuroinfección	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
26-FRND	neuroinfección	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
27-GLNC	absceso intracraneal	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
28-AHL	infarto cerebral	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
29-HAG	neurocisticercosis	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
30-BRE	crisis convulsivas	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

LACN= Látex gasea-globulina anti-C. neoformans.

LGBN= Látex gasea-globulina normal de conejo.

TABLA 11. (cont)

Codigo	Diagnóstico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Hay	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Látex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACN	LGGN
			LACN	LGGN	LACN	LGGN	LACN	LGGN		
31-CPF	neuroinfección	pos	1:64 3+	1:32 3+	1:64 2+	1:64 2+	neg	neg	1:64 3+	1:64 3+
32-MCO	toxoplasmosis y SIDA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
33-LDD	tétanos	pos	1:4 2+	neg	neg	neg	neg	1:8 2+	1:8 2+	1:4 2+
34-ARO	toxoplasmosis y SIDA	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1:8 3+	neg
35-HVA	lupus eritematoso sistémico	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1:2 2+	1:2 2+
36-BPD	neuroinfección	neg	neg	neg	1:4 2+	neg	1:8 2+	neg	neg	neg

LACN= Látex gamma-globulina anti-C. neoformans.

LGGN= Látex gamma-globulina normal de conejo.

TABLA 12. Prueba de aglutinación en látex y factor reumatoide (FR) utilizando sueros de individuos sanos

Codigo	Diagnostico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Hay	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Látex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACN	LGGN
			LACN	LGGN	LACN	LGGN	LACN	LGGN		
37-RJV	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
38-JLV	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
39-PML	sano	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1:4 3+	neg
40-DBH	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
41-IMN	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
42-OPS	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
43-JLN	sano	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
44-FRO	sano	pos	1:32 2+	1:16 2+	1:64 2+	1:8 2+	neg	neg	1:32 2+	1:32 2+
45-PAB	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

LACN= Látex: gamma-globulina anti C. neoformans.

LGGN= Latex: gamma-globulina normal de conejo.

TABLA 13. Prueba de aglutinación en látex de las muestras de suero y factor reumatoide (FR) después del tratamiento con DTT

Código	Diagnóstico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Ha.	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Latex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACN	LGGN
			LACN	LGGN	LACN	LGGN	LACN	LGGN		
6-SHR	criptococosis y SIDA	neg	1:8 4+	neg	1:32 2+	neg	1:4 3+	neg	1:64 3+	neg
10-BAJ	criptococosis	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
33-LDD	tétanos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
39-PML	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
43-JLM	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
44-FRO	sano	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

LACN= Látex gamma-globulina anti *C. neoformans*

LGGN= Látex gamma-globulina normal de conejo

DTT = Ditiotritol

TABLA 14. Prueba de aglutinación en látex en las muestras de LCR y factor reumatoide (FR) después del tratamiento con DTT

Código	Diagnóstico	FR	Método de Harrell et al.						Método de Hudson & Hay	
			Látex sensibilizado (Diluciones)						Látex sensibilizado concentrado	
			1:100		1:400		1:800		LACN	LGGN
			LACN	LGGN	LACN	LGGN	LACN	LGGN		
10-BAJ	criptococosis	neg	1:64 4+	neg	1:64 2+	neg	1:16 2+	neg	1:64 2+	neg
16-IPN	criptococosis	neg	1:32 3+	neg	1:16 2+	neg	1:16 2+	neg	1:32 2+	neg
21-TCE	SIDA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
22-RPD	neuroinfección	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
31-CFF	neuroinfección	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
34-MD y SIDA	toxoplasmosis	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
36-BPD	neuroinfección	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

LACN= Látex gamma-globulina anti-*C. neoformans*

LGGN= Látex gamma-globulina normal de conejo

DTT = Ditiotreitól

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ajello L, Georg LK, Kaplan W, Kaufman L, 1966. Laboratory Manual for Medical Mycology. U.S. Department of Health, Education and Welfare. CDC. Atlanta Georgia. pp E3-E20.
- 2) Arenas G, Toriello C. 1986. Actividad inmunologica de antígenos miceliales y levaduriformes de diferentes fases de crecimiento de Sporothrix schenckii. Rev Mex Mic. 2:131-144.
- 3) Atkinson AJ, Bennett JE. 1968. Experience with a new skin test antigen prepared from Cryptococcus neoformans. Am Rev Resp Dis. 97:637-643.
- 4) Asznowicz R, Newton-John H, Kaldor J. 1979. Value of latex test in Cryptococcal meningitis. Med J Aust. 1:347 - 349.
- 5) Bell WE. 1981. Treatment of Fungal Infectious of the Central Nervous System. Ann Neurol. 9:417-422.
- 6) Bennett JE. 1971. Control for rheumatoid factor in the latex Test for cryptococcosis. A J C P. 56:360-365.
- 7) Bennett JE. 1978. Biochemical differences between serotypes of Cryptococcus neoformans. Sabouraudia. 16:167-174.
- 8) Bennett JE. 1981. Cryptococcal skin test antigen: preparation variables and characterization. Infect Immun 32:373-380.
- 9) Berlin L, Pincus JH. 1989. Cryptococcal meningitis. False negative antigen tests results and cultures in non-immunosuppressed patients. Arch Neurol. 46:1312-1316.
- 10) Bloomfield N, Gordon MA, Elmendorf DF. 1963. Detection of Cryptococcus neoformans antigen in body fluids by latex particle agglutination. Proc Soc Exp Biol Med. 114:64-67
- 11) Bodey GP, 1990. Fungal infectious in cancer patients-An overview. Pfizer International. Houston Texas.USA.
- 12) Bonifaz, A. Garibay, C. 1991. Estudio comparativo del diagnóstico micológico de la criptococosis meníngea. Laborat-acta. 3:31-35.

13) Bonifaz A. 1990. Micología Médica Básica. Mendez-Cervantes. México DF.

14) Bottone EJ, Toma M, Johansson BE, Wormser GP. 1986. Poorly encapsulated Cryptococcus neoformans from patients with AIDS. I: Preliminary observations. AIDS Research. 2:211-218.

15) Bottone EJ, Wormser GP. 1985. Capsule-deficient cryptococci in AIDS. Lancet. 553.

16) Byrne WR, Wojszczyk CP. 1988. Cryptococcal meningitis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS): Successful treatment with fluconazole after failure of amphotericin B. Ann of Intern Med. 108:384-385.

17) Cameron ML, Bartlett JA, Gallis HA, Waskin HA. 1991. Manifestations of Pulmonary Cryptococcosis in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. Rev Infect Dis. 13:64-67.

18) Carrada Bravo T, Del campo-Pérez M, Albarran Portilla MA, Carrillo Farga J. Estudio epidemiológico del Cryptococcus neoformans en México. Rev Invest Sal Pub. 3:92-104.

19) Cochius JI, Burns RJ, Willoughby JD. 1989. CNS Cryptococcosis: Unusual aspects. Clin Exp Neurol. 26:183-191.

20) Concus AP, Helfand RF, Imber MJ, Lerner EA, Sharpe RJ. 1988. Cutaneous Cryptococcosis mimicking molluscum contagiosum in a patient with AIDS. J Infect Dis. 158:897-898.

21) Cutsem JV, Janssen PAJ. 1991. Experimental Cryptococcosis. Abstracts X congress of the international society for human and animal mycology. Barcelona. RT5-1.

22) Desmet P, Kayembe KD, De Vroey C. 1989. The value of cryptococcal serum antigen screening among HIV-positive/AIDS patients in Kinshasa, Zaire. Current Science AIDS. 3:77-78.

23) Dismukes WE. 1988. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. J Infect Dis. 157:624-628.

24) Dolan CT. 1972. Specificity of the latex-cryptococcal antigen test. A J C P. 58:358-364.

25) Dromer F. 1991. Role des Immunoglobulines G et du complément au cours de cryptococcoses. J Mycol Méd. 118:43-49.

26) Dromer F, Perronne C, Barge J, Vilde JL, Yeni P. 1989. Role of IgG and complement component C5 in the initial course of experimental cryptococcosis. Clin Exp Immunol. 78:412-417.

27) Drouhet E, Dupont B. 1987. Evolution of antifungal agents: past, present, and future. Rev Infect Dis. 1:4-14.

28) Dubois M, Giles K, Hamilton K, Reber PA, Smith F. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. Nature. 168:167.

29) Dupont B. 1989. Cryptococcosis. Rev Prat. 39:1663-1668.

30) Eng RH, Person A. 1981. Serum cryptococcal antigen determination in the presence of rheumatoid factor. J Clin Microbiol. 14:700-702.

31) Ernst JF. 1989. Molecular genetics of pathogenic fungi: some recent developments and perspectives. Mycoses. 33:225-229.

32) Fromtling RA, Abruzzo GK, Bulner GS. 1986. Cryptococcus neoformans: Comparisons of *in vitro* antifungal susceptibilities of serotypes AD and BC. Mycopathologia 94:27-30.

33) Fukazawa Y, Kagaya K. 1988. Host defence mechanisms against fungal infection. Microbiol Sci. 5:124-127.

34) Goodwin SD, Fiedler-Kelly J, Grasela TH, Schell WA, Perfect JR. 1992. A nationwide survey of clinical laboratory methodologies for fungal infections. J Med Vet Mycol. 30:153-160.

35) Gordon MA, Lapa E. 1971. Charcoal particle agglutination test for detection of antibody to Cryptococcus neoformans. Am J Clin Path. 56: 354-359.

36) Gordon MA, Lapa EW. 1974. Elimination of rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. Am J Clin Path. 61:488-494.

37) Gordon MA, Vedder DK. 1966. Serologic tests in diagnosis and prognosis of cryptococcosis. J A M A. 197:131-

137.

38) Grant IH, Armstrong D. 1988. Fungal Infections in AIDS: Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2:457-464.

39) Gray LD, Glenn D. Roberts. 1988. Experience with the use of pronase to eliminate interference factors in the latex agglutination test for cryptococcal antigen. J Clin Microbiol. 26:2450-2451.

40) Hall NK, Maluf KC, Blackstock R. 1984. Functional testing and chemical composition of cryptococcal extracts. Sabouraudia. 22:439-442.

41) Hamilton JR, Noble A, Denning DW, Stevens DA. 1991. Performance of Cryptococcus antigen latex agglutination kits on serum and cerebrospinal fluid specimens of AIDS patients before and after pronase treatment. J Clin Microbiol. 29:331-339.

42) Harrell WK, Ashworth H, Britt LE, Gerooge JR, Gray SB, Green JH, Gross H, Johnson JE. 1976. Procedural Manual for Production of Bacterial, Fungal, Parasitic Reagents. US Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. CDC. Atlanta, Georgia. pp 103-106.

43) Hay RJ, Mackenzie DWR. 1982. False positive latex tests for cryptococcal antigen in cerebrospinal fluid. Letters to the editor. 244-245.

44) Hoy JF, Lewis DE, Miller GG. 1988. Functional versus phenotypic analysis of T cells in subjects seropositive for the human immunodeficiency virus: A prospective study of *in vitro* responses to Cryptococcus neoformans. J Infect Dis. 158:1071-1078.

45) Hudson L, Hay FC. 1980. Practical Immunology. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

46) Huppert M. 1983. Antigens. In: Howard DH. (Ed). Fungi pathogenic for human and animals. Marcel Dekker. New York. PP 254-258.

47) Ikeda R, Shinoda T, Furazawa Y, Kaufman L. 1982. Antigenic characterization of Cryptococcus neoformans serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. J Clin Microbiol. 16:22-29.

48) Ikeda R, Nishikawa A, Shinoda T, Fukazawa Y. 1985. Chemical characterization of capsular polysaccharide from Cryptococcus neoformans serotype A-D. Microbiol Immunol. 29:981-985.

49) Ikeda R. et al 1991. Comparison of serological and chemical characteristics of capsular polysaccharides of C. neoformans var. neoformans serotype A and C. albidus var. albidus. Microbiol Immunol. 35:125- 138.

50) Jones PD, Marriott D, Speed BR. 1989. Efficacy of fluconazole in cryptococcal meningitis. Diagn Microbiol Infect Dis. 12:235-238.

51) Kauffman CA, Bergman AG, Severance PJ, McClatchey KD. 1981. Detection of cryptococcal antigen. Comparison of two latex agglutination tests. Am J Clin Pathol. 106-109.

52) Khakpour FR, Murphy JW. 1987. Characterization of a third-order suppressor T cell (Ts3) induced by cryptococcal antigen(s). Infect Immun. 55:1657-1660.

53) Koelme JG, Rustemeijer C, Wijermans PW, MacLaren DM. 1990. Cryptococcal meningo-encephalitis after prolonged corticosteroid therapy. Neth J Med. 36:242-245.

54) Koneman, E W. 1985. Diagnóstico Microbiológico. Panamericana, México DF. 429-469

55) Kovacs JA, Kovacs AA, Polis M, Wright WC, Gill VJ, Tuzon CU, Gelmann EP, Lane HC, Longfield R, Overturf G, Macher AM, Fauci AS, Parrillo JE, Bennett JE, Masur H. 1985. Cryptococcosis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Ann Intern Med. 103: 533-538.

56) Kovacs JA, Masur H. 1988. Opportunistic infections. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. (Eds). AIDS. Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. JB Lippincott Company. Philadelphia. pp 199-211.

57) Kozel TR. 1989. Antigenic structure of Cryptococcus neoformans capsular polysaccharides. In: Kurstak E (Ed). Immunology of Fungal Diseases. Marcel Dekker. New York. 63-85.

58) Kozel TR, Gulley WF, Cazin J. 1977. Immune response to Cryptococcus neoformans soluble polysaccharide: Immunological unresponsiveness. Infect Immun. 18:701-707.

59) Kozel TR, Pfrommer GST, Guerlain AS, Highison BA, Highison BJ. 1988. Role of the capsule in phagocytosis of Cryptococcus neoformans. Rev Infect Dis. 10:436-439.

60) Kwon-Chung KJ, Rhodes JC. 1986. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in Cryptococcus neoformans. Infect Immun. 51:218-223.

61) Kwon-Chung KJ. 1976. Morphogenesis of Filobasidiella, the perfect state of Cryptococcus neoformans. Mycologia. 68:942-946

62) Laroche R, Dupont B, Touze JE, Taelman H, Bogaerts J, Kadio A, M'Pele P, Latif A, Aubry P, Durbec JP, Saunier JF. 1992. Cryptococcal meningitis associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in African patients: treatment with fluconazole. J Med Vet Mycol. 30:71-78.

63) Lauter C B. 1977. Commercial test sensitivity to cryptococcal antigen. Ann intern Med. 86:240.

64) Li ND. 1989. Cryptococcal granuloma of the brain. Rept of 7 cases. Chung-Hua-Wai_Ko-Tsa-Chih. 27:472-473, 509.

65) Loaliza Loeza MS. 1988. Criptococosis. Infectologia. 8:387-395.

66) Lowry CH, Rosebrough NJ, Parr AL, Randall RJ. 1951. Protein-measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem. 193: 265-275.

67) Nakamura Y, Ishizaki H, Wheat RW. 1977. Serological cross reactivity between group B Streptococcus, Sporothrix schenckii, Ceratomyces y Graphium species. Infect Immun. 16: 547-549.

68) Mackenzie DWR. 1983. Serodiagnosis. In: Howard DH. (Ed). Fungi pathogenic for human and animals. Marcel Dekker. New York. pp 254-258.

69) Meunier F. 1990. Current progress in antifungal therapy: the value of fluconazole. Rev Med Brux. 11:278-282.

70) McManus EJ, Jones JM. 1985. Detection of a Trichosporon beigeli antigen cross-reactive with Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide in serum from a patient with disseminated Trichosporon infection. J Clin Microbiol. 21:681-685

71) Min KH, Kwon-Chung KJ. 1986. The biochemical basis for the distinction between the two Cryptococcus neoformans varieties with CGB medium. *Zbl Bakt Hyg.* 261:471-480.

72) Mody CH, Lipscomb MF, Street NE, Toews GB. 1990. Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes *in vivo* impairs murine host defense to Cryptococcus neoformans. *J immunol.* 144:1472-1477.

73) Murphy JW, Gregory JA, Larsh HW. 1974. Skin testing of guinea pigs and footpad testing of mice with a new antigen for detecting delayed hypersensitivity to Cryptococcus neoformans. *Infect Immun.* 9:404-409.

74) Murphy JW, Pahlavan N. 1979. Cryptococcal culture filtrate antigen for detection to delayed type hypersensitivity in cryptococcosis. *Infect Immun.* 25:284-292.

75) Murphy JW. 1991. Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi. *Annu Rev Microbiol.* 45:509-538.

76) Murphy J W. 1988. Influence of cryptococcal antigens on cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis.* 10:432-435.

77) Murphy JW, Cox RA. 1988. Induction of antigen - specific suppression by circulating Cryptococcus neoformans antigen. *Clin Exp Immunol.* 73:174-180.

78) Murphy JW. Immunoregulation in Cryptococcosis. 1989. In: Kurtak E (Ed). *Immunology of fungal diseases*. Marcel Dekker. New York. pp 319-345.

79) Murphy JW, Mosley RL. 1985. Regulation of cell-mediated immunity in cryptococcosis. III. Characterization of second-order T suppressor Cell (Ts2). *Am Assoc Immunolog.* 134:577-583.

80) Niemhom S, Petchclai B, Pupaibul K, Waropastrakul C. 1990. Evaluation of latex cryptococcal agglutination test in cryptococcal meningitis. *J Med Assoc Thai.* 73:12-15.

81) Palmer DF, Kauffman L, Kaplan W, Cavallaro JP. 1977. *Serodiagnosis of Mycotic Diseases*. Charles C Thomas. Springfield, Illinois. pp 94-106.

82) Pérez MA, Toriello C. 1989. Condiciones óptimas para la producción de antígenos de Aspergillus fumigatus, A. niger y A. flavus para el diagnóstico serológico de la aspergilosis. *Rev Mex Mic.* 5:261-271.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

83) Payne AL, Teall AJ. 1989. Trichosporon beigellii infection in an immunocompromised host. Mycoses. 32:183-186.

84) Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ. 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in Cryptococcus neoformans. J Bacteriol. 150:1212-1220.

85) Polak A. 1989. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. Mycoses. 33:215-223.

86) Prevost E, Newell R. 1978. Commercial cryptococcal latex kit: Clinical evaluation in a Medical Center Hospital. J Clin Microbiol. 8:529-533.

87) Repentigny LD. 1989. Circulating antigens in systemic fungal diseases. 471-480.

88) Rhodes JC, Polacheck I, Kwon-Chung KJ. 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of Cryptococcus neoformans. Infect Immun. 36:1175-1184.

89) Rippon JW. 1990. Tratado de Micología. Interamericana-Mc Graw Hill. México DF.

90) Sekhon A S, Bannerjee SN, Mielke BM, Idikio H, Wood G, Dixon JMS. 1990. Current status of cryptococcosis in Canada. Mycoses. 33:73-80.

91) Schutzhart E. 1988. Treatment of cryptococcal meningitis with high-dose long-term combination amphotericin B and flucytosine. Am J Med. 85:737-738.

92) Scholer HJ. 1985. Diagnosis of cryptococcosis and monitoring of chemotherapy. Mykosen. 28:5-16.

93) Shadomy H J, Wood-Helie S, Shadomy S, Dismukes WE, Chau RY. 1987. Biochemical serogrouping of clinical isolates of Cryptococcus neoformans. Diag Microbiol Infect Dis. 6:131-138.

94) Simberkoff MS, Zuger A. 1988. Cryptococcosis in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA. (Eds). AIDS. Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. JB Lippincott. New York. 267-284.

95) Staib F. 1988. Cryptococcus neoformans and cryptococcosis historical background. Abstracts X congress of the international society for human and animal mycology. pag 5.

96) Staib F, Seibold M, L'age M, Heise W, Skörde J, Grosse G, Nürnberger F, Bauer G. 1989. Cryptococcus neoformans in the seminal fluid of an AIDS patient. A contribution to the clinical course of cryptococcosis. Mycoses. 32:171-180.

97) Staib F, Seibold M, L'age M. 1990. Persistence of Cryptococcus neoformans in seminal fluid and urine under itraconazole treatment. The urogenital tract (prostate) as a niche for Cryptococcus neoformans. Mycoses. 33:369-373.

98) Staib F, Seibold M. 1989. Use of the membrane filtration technique and Staib agar for the detection of Cryptococcus neoformans in the urine of AIDS patients. A contribution to diagnosis, therapy and pathogenesis of cryptococcosis. Mycoses. 32:63-72.

99) Stockman L, Glenn DR. 1983. Corrected version. Specificity of the latex test for cryptococcal antigen: A rapid, simple method for eliminating interference factors. J Clin Microbiol. 17: 945-947.

100) Sugar AM, Stern JJ, Dupont B. 1990. Overview: treatment of Cryptococcal meningitis. Rev Infect Dis. 3:338-348.

101) Viviani MA, Tortorano AM. 1988. Management of cryptococcosis in AIDS patients. Abstracts of the X congress of the international society for human and animal mycology. Barcelona.pp RT17-1

102) Walsh TJ, Hier DB, Caplan LR. 1985. Fungal infection of the central nervous system: Comparative analysis of risk factors and clinical signs in 57 patients. Neurology. 35:1654-1657.

103) Washton H. 1989. Review of fluconazole: A new triazole antifungal agent. Diagn Microbiol Infect Dis. 12:229-233.

104) White CW, Jacobson ES. 1990. Side group addition by xylosyltransferase and glucuronyltransferase in biosynthesis of capsular polysaccharide in Cryptococcus neoformans. J Med Vet Mycol. 28:289-301.