

39
2eje



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DESARROLLO DE LA TECNICA DE
AGLUTINACION EN LATEX PARA LA
DETECCION DEL ANTIGENO CAPSULAR
DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA LUISA MILLAN CURENO

Director de Tesis:
PhD. Roberto A. Cervantes Olivares
Asesor de Tesis:
MVZ Enrique Salas Téllez

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.B. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Desarrollo de la Técnica de Aculturación en Látex

para la detección del Antígeno capsular de Cryptococcus
neoformans"

que presenta la pasante: María Luisa Millán Curiel

con número de cuenta: 133523-0 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Febrero de 1974

PRESIDENTE Ph.D. Roberto Cervantes Olivares

VOCAL C.F.B. Andrea Becerra Conzoya

SECRETARIO Dr. Marco A. Vega López

PRIMER SUPLENTE C.F.B. Víctor K. Zendejas Buitrón

SEGUNDO SUPLENTE L.F.B. Edgar Acuña Carón

Agradecimientos:

Al Doctor Roberto A. Cervantes Olivares por permitirme
trabajar con él.

A Enrique Salas Téllez por tu asesoramiento.

A un gran profesional: G.F.B. Edgar Aguilera Cerón gracias por
tus valiosas asesorías y la admirable paciencia que tuviste
conmigo para disipar mis dudas.

Al personal de investigación de la coordinación de estudios de
posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
U.N.A.M. por su ayuda para la realización de éste trabajo.

A mi motivo de vivir y seguir adelante:

Mi madre Ma. Luisa.

Mis hermanos:

Juana Guillermina.

Guillermo.

José Alfredo.

Nicolás.

Gustavo.

Mis sobrinos:

Juan Luis.

Tania.

Janine.

Alfredo.

Humberto.

porque los quiero, porque siempre sabré que puedo contar con
ustedes.

A Alfonso : gracias por tu cariño y comprensión, que
incondicionalmente me has brindado para realizar todos mis
propósitos.

A mi tío Lorenzo y Ricardo y mis primos Jorge e Isela.

" PARA SER ALGUIEN,
NO SE NECESITA SER ALGO "

Sabouraud.

INDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	2
A) GENERALIDADES.....	2
B) ECOLOGIA.....	2
C) MORFOLOGIA.....	3
D) CARACTERISTICAS CLINICAS.....	7
E) INMUNOLOGIA.....	8
F) METODOS DE DIAGNOSTICO.....	13
G) TRATAMIENTO.....	15
II. OBJETIVO.....	17
III. MATERIAL Y METODOS.....	18
IV. RESULTADOS.....	27
V. DISCUSION.....	37
VI. CONCLUSIONES.....	42
VII. APENDICE.....	43
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	48

RESUMEN.

Se desarrolló la técnica de aglutinación en látex para la detección del antígeno capsular de Cryptococcus neoformans variedad neoformans y variedad gattii. Se extrajo el antígeno soluble (Extracto crudo de Polisacárido) de éste hongo, por técnicas de filtración y centrifugación. Se produjo suero hiperinmune Anti-Cryptococcus neoformans en conejos raza Nueva Zelanda, hasta obtener un título de aglutinación en placa con células completas de 1:1024 para la variedad gattii y 1:2048 para variedad neoformans. Este suero se utilizó para recubrir partículas de látex y utilizarlas en la detección de antígeno soluble. Como control negativo se utilizó partículas de látex sensibilizadas con suero normal de conejo. La mínima concentración de antígeno soluble detectada por ésta técnica es de 25 ng/ml para la variedad neoformans y 19 ng/ml para la variedad gattii.

I. INTRODUCCION.

A) Generalidades.

La criptococosis es una micosis de curso subagudo o crónico, causada por un hongo levaduriforme, denominado Cryptococcus neoformans se caracteriza por afectar inicialmente pulmones y posteriormente se disemina a piel y vísceras, con una clara predilección por el sistema nervioso central (5), la criptococosis es conocida también como "Blastomicosis Europea" (Enfermedad de Busse-Buschke ó meningitis Torular. (Torula hystolitica) (1) es una enfermedad de distribución mundial que afecta tanto al hombre como a los animales.

El agente etiológico de la criptococosis, Cryptococcus neoformans presenta dos variedades: C. neoformans var. neoformans y C. neoformans var. gattii (28).

B) ECOLOGIA.

La vía de entrada es casi siempre respiratoria, sin embargo, existen informes de casos cutáneos primarios, que se inician por la inoculación a través de una solución de continuidad. C. neoformans también puede ingresar por vía oral (frutos, leche), pero la lisozima salival y el pH del estómago lo inactivan la mayoría de las veces (5,44).

Durante mucho tiempo se consideró un padecimiento raro, sin embargo en la actualidad su frecuencia es mayor, ya que se presentan casos de criptococosis asociados con

enfermedades debilitantes del sistema inmune como leucemia, diabetes mellitus, linfoma, sarcoma; con enfermos tratados con corticosteroides, en pacientes con transplantes renales y con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (44,47). El hábitat natural más importante y frecuente de la variedad neoformans es la excreta de paloma. El guano de las aves es por lo regular alcalino, y tiene una gran cantidad de productos nitrogenados, que mantienen viable al microorganismo por varios meses (13,40,47). La variedad gattii se ha aislado de casos clínicos y se reconoce como su hábitat natural a varias especies de eucaliptos (12).

C) MORFOLOGIA.

A C. neoformans se le han encontrado dos estados perfectos o telemórficos, que corresponden a basidiosporas y se denominan Fillobasidiella neoformans (27). C. neoformans no forma pseudomicelio ni clamidosporas y en suero, no genera brotes ni tubos germinativos, es un hongo que presenta forma de levadura tanto in vivo como in vitro, se desarrolla en medios de cultivo habituales como son: Sabouraud dextrosa, extracto de levadura y agar Infusión Cerebro Corazón; es inhibido por cicloheximida. Genera colonias mucoides, convexas, brillantes de color blanco amarillento. Cuando la cepa se siembra en medio de semilla de niger (Guizotia abyssinica) genera pigmentos café-marrón, debido a que transforma el ácido cafeínico que contiene la semilla, en un compuesto polimérico

de estructura química similar a la melanina(47).

Microscópicamente C. neoformans se presenta como un hongo levaduriforme capsulado que llega a medir de 15-20 micras de diámetro con gemas de la mitad de su tamaño, el resto lo forma la cápsula que llega a ser hasta 3 veces el tamaño de la levadura, en los medios de cultivo y en especial en resiembras posteriores, la cápsula tiende a reducirse o inclusive a desaparecer, para evitar este fenómeno es necesario resemar el hongo en LCR estéril o hacer un pase en ratón(5).

Para distinguir a C. neoformans de otros géneros de levaduras, se realizan otras pruebas sencillas que se resumen en el cuadro 1 (5,47).

Existen otras especies de Cryptococcus que no son patógenas, microscópica y macroscópicamente son similares a C. neoformans, por lo que hay que diferenciarlas por pruebas fisiológicas y térmicas. En el cuadro 2 se resumen algunas de las propiedades más importantes(5,47).

CUADRO 1.

PROPIEDADES DE LOS DIVERSOS HONGOS LEVADURIFORMES DE INTERES MEDICO.

Producción	<u>C.neoformans</u>	<u>Candida</u> sp	<u>Torulopsis</u> sp	<u>Trichosporum</u>
Formación de cápsula	+	-	-	-
Producción de ureasa	+	-	-	-
Producción de pseudohifas	-	+	-	+
Pigmento en Medio de niger	+	-	-	-
Ascosporas	-	-	-	-
Basidiosporas	+	-	-	-

CUADRO 2. PROPIEDADES DE DIFERENTES ESPECIES DEL GENERO
CRYPTOCOCCUS.

Propiedades	<u>C.</u> <u>neoformans</u>	<u>C.</u> <u>albidus</u>	<u>C.</u> <u>laurentii</u>	<u>C.</u> <u>gastricus</u>	<u>C.</u> <u>terreus</u>
Producción de ureasa	+	+	+	+	+
Crecimiento a 37°C	+	-	-	-	-
Crecimiento a 40°C	+	-	-	-	-
Utilización de KNO ₃	-	+	-	-	+
Virulencia en el ratón	+	-	-	-	-
Producción de pigmento en medio de niger	+	-	-	-	-

El perfil bioquímico de los carbohidratos para C. neoformans es: asimilación positiva de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, trealosa, ramnosa; en ocasiones la rafinosa y nunca la lactosa(45).

Las diferencias bioquímicas entre ambas variedades han permitido la formulación de medios como el CDB que contiene creatinina, dextrosa y azul de bromotimol(43) y el medio CGB que contiene l-canavanina, glicina y azul de bromotimol(38), éstos dos medios favorecen el desarrollo de la variedad gattii, mientras que para variedad neoformans inhiben su crecimiento.

D) CARACTERISTICAS CLINICAS.

Dentro de las enfermedades que puede causar C. neoformans, se encuentra la criptococosis pulmonar que se inicia por la inhalación de las levaduras, éstas llegan hasta los alvéolos atravesando las vías respiratorias generando así el primocontacto pulmonar, que la mayoría de las veces cursa de manera subclínica o asintomática y no genera una respuesta inflamatoria tan intensa como lo hacen otros hongos o micobacterias. C. neoformans prolifera rápidamente si no existe una adecuada respuesta celular, en especial células mononucleares, linfocitos, histiocitos, etc., esto explica por qué los pacientes linfomatosos son altamente susceptibles a la enfermedad. Si el proceso infeccioso no se detiene, los microorganismos fácilmente se diseminan por vía linfática y

hematógena, con gran predilección hacia el sistema nervioso central, en donde las lesiones se desarrollan en las meninges y afectan los nervios craneales, tallo cerebral y cerebelo; el cuadro que provoca es generalmente de una meningitis crónica (5,41,50).

E) INMUNOLOGIA de C. neoformans.

Se conocen tres serotipos antigénicos de C. neoformans A, B y C, todos asociados con los polisacáridos capsulares (14); en 1968 Wilson y col. agregaron otro tipo antigénico designado como D(51).

La única especie del género Cryptococcus que es patógena es la neoformans en sus dos variedades neoformans y gattii y su patogenicidad se atribuye a la cápsula(28,37).

El interés por dilucidar la estructura del polisacárido que conforma la cápsula de C. neoformans ha llevado a estudios como los realizados por Evans y Kessel(15); y Blandamer y Danishefsky(3), donde mencionan que la cápsula es un determinante de patogenicidad; Murphy y Goren (19,36), encontraron que una alta dosis inmunogénica de polisacárido da como resultado una supresión de células esplénicas hemolíticas. Kozel(26), estudió las propiedades antifagocíticas de la cápsula y encontró que in vitro la fagocitosis de una mutante acapsular de C. neoformans, fué inhibida por 10 microgramos por ml. de polisacárido criptococal, y que el polisacárido alteró a los receptores en

la levadura inhibiendo la adherencia de los macrófagos de ratón. Por otro lado, Bulmer, estudiando la fagocitosis del C. neoformans en leucocitos humanos, observó que las cepas mutantes acapsuladas eran fagocitadas de un 70 a 80% por los leucocitos, mientras que las capsuladas eran fagocitadas en menos del 20%. Por lo que se puede deducir que en verdad la cápsula es la causante de la patogenicidad(6). Todos éstos estudios llevaron a dilucidar la estructura del polisacárido hecha por Bhattacharjee A.K. y col. en 1978, encontrando que el polisacárido criptococal es una GlucuroXiloManana (GXM), responsable directa de la diferenciación en serotipos, la cual contiene cadenas laterales que contienen ácido glucurónico y grupos o-acetil. Cada uno de éstos determinantes confiere propiedades fisicoquímicas distintivas para la superficie capsular. Existe una variación natural entre los serotipos de Cryptococcus en la cantidad de sustituyentes o-acetilo y xilosilo. La o-acetilación varía de 10.3% en el serotipo D y 3% en el serotipo C. Sin embargo la sustitución de xilosilo varía en una proporción xilosa/manosa de 1:3 en el serotipo C (2).

Los enlaces consisten de ligaduras lineales (1-3) de mananas sustituidas en posiciones 2-o (o=orto) por residuos simples de xilosa o ácido glucurónico ya sea uno u otro.

La figura 1 muestra un esquema de un octasacárido que es una unidad repetitiva de GXM, polisacárido que compone la cápsula de C. neoformans (2,8).

La última posibilidad debe ser considerada porque el polisacárido cryptococócico ha demostrado inactivar a la properdina y consume los últimos componentes del complemento cuando se encuentra en altas concentraciones (10,18).

En 1974 Neilson, J.B. y col. (citados por Bulmer y Nhuan) demostraron que el suero no se requería para fagocitar y englobar a las levaduras que eran muertas. Cuando se extrajo mieloperoxidasa de los leucocitos periféricos humanos se encontró que fué letal para C. neoformans y otros hongos patógenos. Así parece que la mieloperoxidasa es un factor anticryptococócico importante que se encuentra en los leucocitos periféricos humanos(6).

Los macrófagos juegan un papel crítico en la inmunoinducción, incluyendo el catabolismo y presentación de antígeno para que respondan los linfocitos. El papel auxiliar de los macrófagos incluye la habilidad para desencadenar una serie de moléculas regulatorias, que pueden modificar la proliferación de linfocitos y su diferenciación. La retro regulación por distintas subpoblaciones de linfocitos T, ha sido observada, cuando el producto de una estimulación de linfocitos puede regular la actividad tumoricida que tienen los macrófagos. Esto ha sido mostrado dentro del laboratorio, con ratones inoculados con C. neoformans demostrando una disminución en la respuesta inmune. Durante el desarrollo de la enfermedad, el ratón infectado con C. neoformans exhibe

depresión en la respuesta inmunohumoral y depresión en la respuesta de células mediadoras de la inmunidad (mitógenas), para los antígenos específicos y para los linfocitos T dependientes de antígeno(31,33,34).

Investigando la puerta de entrada de C. neoformans (6) se ha descubierto lo siguiente (usando cuyos y macrófagos pulmonares humanos):

- Los macrófagos pulmonares engloban a las células no capsuladas de C. neoformans .
- El proceso de fagocitosis fue inhibido por material capsular cryptococócico.
- Los macrófagos alveolares engloban al C. neoformans pero no lo matan.
- Los macrófagos alveolares no contienen mieloperoxidasa.

Estos descubrimientos hicieron dudar acerca de la efectividad de los macrófagos alveolares como una primera barrera celular de defensa considerando más importante una segunda barrera que dispone de ellos vía capa mucociliar en el tracto gastrointestinal, o bien un secuestro en el pulmón, induciendo un estado de éstasis. Si lo último es verdad es posible que las células de C. neoformans pueden encontrarse en estado latente en muchos individuos aparentemente sanos. Más adelante durante una fluctuación inmunológica, éstas células pueden activarse, multiplicándose y diseminándose, eventualmente resultando en un estado de enfermedad. La definición de los defectos de la defensa del hospedero,

responsable de la predisposición a micosis, quizá abra el camino de la inmunomodulación, ésto produce un acercamiento a la prevención o terapia(9).

F) METODOS DE DIAGNOSTICO.

La toma de muestra dependerá del tipo de criptococosis, por lo que se puede manejar expectoración, lavado bronquial, LCR, exudados, biopsias.

La mayoría de las criptococosis que se diagnostican son meníngeas, las condiciones de LCR son muy específicas, en un inicio prácticamente es un fluido normal, pero en casos crónicos las características que presenta son turbidez, disminución de glucosa, aumento de proteínas, aumento de la densidad y celularidad.

El exámen directo es de poca utilidad, porque mediante esta técnica no se hace evidente la cápsula; por lo tanto las levaduras fácilmente se confunden con Candida sp. u otros hongos levaduriformes (5,47).

Los frotis se hacen a partir de las muestras de LCR, esputo, etc., y se agrega extendiendo una gota de tinta china o nigrosina; por refringencia con el microscopio se puede observar fácilmente el cuerpo de la levadura y el halo de la cápsula, o también poniendo una gota de fucsina básica (de Ziehl-Neelsen) por un minuto y posteriormente se tife en contraste con tinta china; los resultados son buenos, obteniendo el cuerpo de la levadura de color rojo-rosa, un

halo blanco de la cápsula y el fondo de la preparación en negro. Algunos autores reportan excelentes resultados con tinción de musicarmina de Mayer, este colorante tiñe la cápsula en fracciones. Las biopsias son útiles sobre todo para los casos cutáneos, donde se presenta por lo regular una reacción inflamatoria crónica constituida por abundantes células gigantes, linfocitos y eosinófilos. Las células levaduriformes se distinguen con facilidad con tinciones de Hematoxilina y Eosina, o musicarmina de Mayer. Los rayos X y tomografias son de gran utilidad para los casos pulmonares y meníngeos (5,47).

Pruebas serológicas.

Las pruebas serológicas para antígenos y/o anticuerpos de Cryptococcus neoformans deben indicarse en pacientes con síntomas de infección pulmonar o meníngea. Se han probado diversas pruebas inmunológicas y ninguna da resultados satisfactorios en su totalidad, la más recomendable es aglutinación en látex (técnica para medir antígeno) con fluidos tales como líquido cefalo Raquídeo, suero u orina, ésta prueba permite detectar hasta 35 ng/ml de antígeno (4,30,32), también se ha realizado la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFA) y fijación de complemento. Recientemente se ha desarrollado un paquete de ELISA que permite la detección de una concentración de antígeno de 6 ng/ml (32). Las pruebas con base en la detección de anticuerpos (prueba de IFA y Aglutinación en tubos) son

valiosas para detectar criptococosis precoz o localizada y para dar un pronóstico(29). En un reporte de 1985, Scholer, menciona positividad de 90-95% para la aglutinación en látex en líquido cefalo Raquídeo de personas sin tratar que sufren criptococosis meníngea(44). En 1986, Kaufman y Blumer (citado por Rose), observaron que la criptococosis se diagnostica mejor serológicamente a través del uso simultáneo de tres pruebas: la de aglutinación en látex para detectar antígeno y las de IFA y aglutinación en tubos para anticuerpos contra C. neoformans. Un falso positivo con la prueba de aglutinación en látex es raro y solo ocurre con el suero de pacientes que sufren artritis reumatoide severa (25,42), para eliminar éstos factores, la muestra se trata con ditiotreitól 0,003 M. (39), y más recientemente mediante una extracción con EDTA caliente(49). La inoculación de ratones jóvenes por vía intracerebral es un método auxiliar para el diagnóstico de criptococosis. Es importante mencionar que los resultados de éstas pruebas deben correlacionarse con los aspectos micológicos (cultivo y observación directa).

G) TRATAMIENTO.

El tratamiento de elección para la criptococosis es a base de anfotericina B pero los mejores resultados terapéuticos se obtienen al combinar los esquemas terapéuticos, por ejemplo anfotericina B-5 Fluorocitocina y sobre todo anfotericina B con fluconazol (21,48). El uso de derivados de los imidazoles

(Ketoconazol e itraconazol), por vía oral a dado buenos resultados en el tratamiento de ésta micosis, pero estudios recientes han demostrado resistencia in vitro de C. neoformans a estas drogas(24).

II. OBJETIVO GENERAL:

- Desarrollar la técnica de aglutinación en látex para la detección del antígeno capsular de C. neoformans.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Obtener del antígeno soluble de la cápsula de Cryptococcus neoformans variedades neoformans y gattii.
- b) Producir suero hiperinmune Anti-Cryptococcus neoformans variedades neoformans y gattii en conejo.
- c) Recubrir partículas de látex con anticuerpos anti-C. neoformans ambas variedades.
- d) Determinar las condiciones experimentales para la detección de la mínima concentración de antígeno soluble de C. neoformans por medio de la técnica de aglutinación con partículas de látex.

III. MATERIAL Y METODOS

A) PREPARACION DEL ANTIGENO

Cultivo de Cryptococcus neoformans:

cepas: Cryptococcus neoformans variedad neoformans.

Cryptococcus neoformans variedad gattii.

Estas cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Micología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1.

Para cultivar las dos cepas se utilizó el caldo GGA-B (Caldo Glutamina Glicina Asparagina) descrito por Chaskes and Tyndal (7) y el cual se seleccionó por proveer a Cryptococcus neoformans de un buen tamaño de cápsula (ver apéndice).

Preparación del inóculo:

2 Matraces con 250 ml. del medio GGA-B para inocular C.neoformans var. neoformans.

2 Matraces con 250 ml. del medio GGA-B para inocular C.neoformans var. gattii.

- Los 4 matraces se incuban durante 4 días en agitador rotatorio a una temperatura de 25°C a 180 rpm.
- Se procedió a inactivar los cultivos calentando a 60 °C durante 60 min. (17) ,se determinó la inactivación completa por la ausencia de crecimiento en los subcultivos (éstos se hacen en agar dextrosa sabouraud) (45).
- Se comprobó la inactivación,y se hicieron lavados con

solución salina fisiológica 3 a 4 veces hasta eliminar completamente el medio, el precipitado se resuspendió en solución salina fisiológica, finalmente, se preparó una suspensión de levaduras de 2.4×10^8 células/ml. utilizando para ello una cámara de Neubauer(32).

- La suspensión se mantuvo a 4°C durante el periodo de inoculación de los animales(29).

A.1) PRODUCCION DEL EXTRACTO CRUDO DE POLISACARIDO.

-OBTENCION DEL ANTIGENO SOLUBLE- según Small(46).

- La biomasa obtenida de ambas variedades (neoformans y gattii) se centrifugó a 10 000 gravedades por 30 min. a 4°C (previamente inactivadas con calor a 60°C durante 60 min.).
- El sobrenadante se filtró con membrana millipore de 0.45 micras.
- Este sobrenadante ya clarificado se concentra utilizando la polivinil pirrolidona o azúcar glass.
- El filtrado concentrado se dializa toda la noche a 4°C contra 10 volúmenes de agua desionizada.
- Después de la diálisis se adicionan al sobrenadante acetato de sodio al 10% y ácido acético glacial al 1% a concentración final.
- El polisacárido se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol, frío (4°C) al 95%, durante 24 hrs. en agitación constante (35).
- El precipitado de polisacárido crudo se remueve por

centrifugación y se redisuelve en agua.

- Se dializa por 2 días contra varios cambios de agua desionizada para remover el acetato.
- Se cuantificó la cantidad de azúcares por el método de fenol ácido sulfúrico (11), utilizando como patrón glucosa y se leyó a 485 nm.

B) PRODUCCION DE SUERO HIPERINMUNE.

Los animales elegidos fueron conejos, hembras, raza Nueva Zelanda con un peso aproximado de 2.3 kg., los animales fueron inoculados por vía intravenosa con 2.4×10^8 células/ml. inactivadas por calor, diariamente durante trece días, ocho días después de terminado el esquema se sangraron(32), (ver apéndice para método de sangrado). Con éste suero se realizaron aglutinaciones en placa determinándose un título de 1:2048 para variedad neoformans y 1:1024 para variedad gattii, la prueba de aglutinación se realizó con una suspensión de células completas (antígeno) de ambas variedades: En una placa de aglutinación se colocó 0.4 ml. de antígeno y 0.02 ml. de suero hiperinmune, se homogeneizó con un palillo y se agitó a 180 revoluciones por minuto durante 5 minutos, como control negativo se utilizó suero normal de conejo. También se hicieron pruebas de doble difusión (ver apéndice), determinándose un título de 1:8 para ambas variedades. Al obtenerse los títulos requeridos para las pruebas

experimentales de aglutinación con partículas de látex, se sangraron a los conejos por la vena marginal de la oreja (ver apéndice).

C) SENSIBILIZACION DE PARTICULAS DE LATEX CON ANTICUERPOS.

Según Stockman (49) se puede sensibilizar partículas de látex con suero hiperinmune y con fracción IgG para pruebas de aglutinación, para probar si había alguna diferencia se experimentó con ambas pruebas: del total del suero hiperinmune obtenido se separó la mitad para obtener la fracción IgG, por medio de precipitaciones salinas con sulfato de amonio (42) (ver apéndice). Con la fracción IgG se recubrió un lote de partículas látex y el otro lote de partículas látex restante se recubrió con el suero hiperinmune que no se utilizó para fraccionarse. Para la preparación de la suspensión de partículas látex, se emplearon esferas de poliestireno de 0.81 micrómetros de diámetro (SIGMA), las partículas de látex se suspendieron en amortiguador salino de glicina pH 8.2, la suspensión se colocó en una cubeta de cuarzo y se ajustó a una absorbancia de 0.3 en una longitud de onda de 650 nm. y se incubaron a 37°C por una hora con un volumen igual de suero hiperinmune o de fracción IgG anti-C. neoformans diluido 1:2. (La dilución óptima del suero hiperinmune y de la fracción IgG se seleccionaron por titulaciones en placa utilizando la técnica de titulación llamada "Tablero de ajedrez", donde se

hicieron todas las combinaciones posibles de diluciones dobles seriadas tanto de anticuerpo (Ac), como de antígeno (Ag); por medio de ésta titulación en placa se determinó qué dilución de suero hiperinmune-látex y de fracción IgG-Látex servirían para estandarizar la prueba y se escogió la mayor dilución (1:2), que diera las partículas látex mas sensibles, es decir aquellas partículas de látex sensibilizadas que detectaran adecuadamente la menor cantidad de antígeno posible).

D) PRUEBA DE AGLUTINACION.

(prueba experimental para determinar la dilución óptima de suero hiperinmune y fracción IgG con que serán sensibilizadas las partículas látex).

Reactivos:

Anticuerpos.

Suero hiperinmune contra Cryptococcus neoformans variedad neoformans.

Suero hiperinmune contra Cryptococcus neoformans variedad gattii.

Fracción IgG contra Cryptococcus neoformans variedad neoformans.

Fracción IgG contra Cryptococcus neoformans variedad gattii.

Antígenos.

Extracto crudo de polisacárido de Cryptococcus neoformans

variedad neoformans.

Extracto crudo de polisacárido de Cryptococcus neoformans
variedad gattii.

Testigo.

Testigo negativo: partículas de látex recubiertas con globulina normal de conejo, equipo comercial Crypto LA-TEST Wampole, Laboratories.

Testigo positivo: partículas de látex recubiertas con globulina anti-C. neoformans, equipo comercial Crypto LA-TEST Wampole Laboratories.

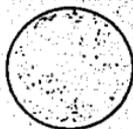
Para la prueba de aglutinación con partículas de látex, se prepararon diferentes concentraciones de extracto crudo de polisacárido (antígeno) de C. neoformans var: neoformans: 12.5, 25.06, 50.12, 100.25, 200.6, 401, 802, 1605, 3210 y 6420 ng/ml. y las siguientes concentraciones de C. neoformans var. gattii: 9.6, 19, 38, 77, 155, 310, 620, 1240, 2480, 4960 ng/ml. para determinar la mínima concentración detectada por éste método. En cada prueba de aglutinación se utilizó como testigo positivo y negativo las partículas de látex provistas en el equipo comercial, Crypto LA-TEST de Wampole Laboratories.

Las pruebas de aglutinación para éste caso se realizaron de la misma forma que la utilizada en la titulación del suero hiperinmune descrita al inicio: En una placa de vidrio para aglutinación, se colocaron: 0.04 ml. de antígeno y se

agregaron 0.02 ml. de anticuerpo unido al látex, se agitó con un palillo y se colocó en cámara húmeda sobre un agitador rotatorio, por cinco minutos a 180 revoluciones por minuto y se procedió a realizar la lectura a contraluz.

Interpretación de resultados.

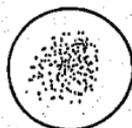
Se estandarizó el tiempo de lectura que fué de cinco minutos, siendo el rango desde negativo (nada de aglutinación), hasta tres cruces, de una cruz o más se consideró reactivo.



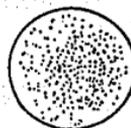
(-)



(+)



(++)



(+++)

GRADO DE AGLUTINACION EN PLACA.

E) PRUEBAS CRUZADAS.

Se hicieron pruebas de especificidad de la técnica de aglutinación desarrollada, se realizó pruebas cruzadas con Cándida albicans la cual es una levadura patógena en el humano y que puede presentar cruces inmunológicos con C. neoformans debido a su parecido estructural; también se hicieron pruebas cruzadas entre las variedades de C. neoformans, se aglutinó anticuerpos variedad neoformans con antígeno variedad gattii; y aparte se aglutinó anticuerpos variedad gattii con antígeno variedad neoformans.

La prueba se hizo de la siguiente manera:

Se mezcló 0.04 ml. de suspensión de células completas de Cándida albicans al 2% (vol/vol) (2×10^8 células/ml. aproximadamente) con 0.02 ml. de partículas sensibilizadas con suero hiperinmune anti-C. neoformans (se utilizaron los mismos volúmenes para hacer las pruebas cruzadas entre ambas variedades de C. neoformans), se mezcló perfectamente con un palillo, se colocó en cámara húmeda sobre un agitador rotatorio, por 5 minutos a 180 revoluciones por minuto y se procede a realizar la lectura a contraluz. Como testigo positivo se utilizó una suspensión de células completas de C. neoformans al 2% (2×10^8 células/ml. aproximadamente) y como testigo negativo se utilizó partículas de látex recubiertas con globulina normal de conejo provistas en el equipo comercial Crypto LA-TEST, Wampole Laboratories. También se

efectuó la prueba con diluciones dobles de la suspensión de células completas de Cándida albicans al 2% (vol/vol).

IV. RESULTADOS.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la valoración de los niveles de anticuerpos en el suero hiperinmune por medio de una titulación en pruebas de doble difusión y en pruebas de aglutinación en placa.

En las tablas 4 y 6 se muestran los resultados de la titulación de las partículas de látex sensibilizadas con suero hiperinmune anti-C. neoformans var. neoformans, como se puede ver la dilución 1:2 de partículas sensibilizadas con suero hiperinmune logra aglutinar hasta un título de 1:256 de extracto crudo de polisacárido, que corresponde en concentración de antígeno de 25.06 ng/ml.

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados de la titulación de las partículas de látex sensibilizadas con la fracción IgG anti-C. neoformans var. neoformans, se observa que de igual manera la dilución 1:2 de partículas de látex sensibilizadas con fracción IgG logra aglutinar hasta una dilución de 1:8 de extracto crudo de polisacárido, que corresponde a una concentración de antígeno de 802 ng/ml.

En la tabla 6 se resumen los resultados de la titulación de las partículas de látex sensibilizadas con suero hiperinmune en comparación con la titulación de las partículas de látex

sensibilizadas con la fracción IgG y muestran en cada una de las pruebas la última dilución de antígeno que detectaron y sus respectivas concentraciones.

De igual forma se pueden interpretar los resultados de las tablas 7, 8 y 9, tratándose de la variedad gattii, también se seleccionó la dilución 1:2 como la óptima para la prueba.

La tabla 10 muestra los resultados de las pruebas cruzadas, donde se puede ver que entre variedades de C. neoformans, si hay cruce inmunológico, pero no hay cruce con Cándida albicans.

B) PRODUCCION DE ANTICUERPOS

TABLA 3.

RESULTADOS DE LA TITULACION DE LOS NIVELES DE
ANTICUERPOS DEL SUERO HIPERINMUNE

TECNICA	ANTIGENO	ANTICUERPO	TITULO
DOBLE DIFUSION	ECP DE C. NEOFORMANS VAR. NEOFORMANS	SUERO HIPERINMUNE	1:8
DOBLE DIFUSION	ECP DE C. NEOFORMANS VAR. GATTII	SUERO HIPERINMUNE	1:8
AGLUTINACION EN PLACA	CELULAS COMPLETAS DE C. NEOFORMANS VAR. NEOFORMANS	SUERO HIPERINMUNE	1:2048
AGLUTINACION EN PLACA	CELULAS COMPLETAS DE C. NEOFORMANS VAR. GATTII	SUERO HIPERINMUNE	1:1024

ECP = EXTRACTO PURO DE POLISACARIDO

TABLA 4.

**TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX
SENSIBILIZADAS CON SUERO
ANTI-Cryptococcus neoformans var. neoformans**

DILUCION DE PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS

CONC.		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
P C E	CONC.+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
	1:2	+++	+++	++	+	+	-	-	-
	1:4	+++	+++	++	+	+	-	-	-
	1:8	+++	+++	++	+	-	-	-	-
	1:16	+++	++	+	+	-	-	-	-
	1:32	+++	++	+	-	-	-	-	-
	1:64	++	++	+	-	-	-	-	-
	1:128	++	+	-	-	-	-	-	-
	1:256	++	+	-	-	-	-	-	-

ECP= EXTRACTO CRUDO DE POLISACARIDO

TABLA 5.

TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX
 SENSIBILIZADAS CON IgG
 ANTI-Cryptococcus neoformans var. neoformans

DILUCION DE PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS

	CONC.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
E C P	CONC.+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
	1:2	+++	++	-	-	-	-	-	-
	1:4	+++	+	-	-	-	-	-	-
	1:8	++	+	-	-	-	-	-	-
	1:16	+	-	-	-	-	-	-	-
	1:32	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:64	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-

ECP= EXTRACTO CRUDO DE POLISACARIDO

TABLA 6.

RESULTADO DE LA TITULACION DE SUERO HIPERINMUNE - LATEX
Y FRACCION IgG - LATEX (DETERMINACION DE LA MINIMA
CONCENTRACION DE POLISACARIDO VAR. NEOFORMANS) POR
AGLUTINACION

NUM.	DILUCION DE ECP	ECP VAR. NEOFORMANS (ng/ml)	TESTIGO +	TESTIGO -	LATEX SUERO DIL. 1:2	LATEX IgG DIL. 1:2
1	CONC.	6420	+++	-	+++	+++
2	1:2	3210	+++	-	+++	+++
3	1:4	1605	+++	-	+++	++
4	1:8	802	+++	-	+++	+
5	1:16	401	+++	-	++	-
6	1:32	200.5	+++	-	++	-
7	1:64	100.25	++	-	++	-
8	1:128	50.12	++	-	+	-
9	1:256	25.06	++	-	+	-
10	1:512	12.53	++	-	-	-

TABLA 7.

TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX
 SENSIBILIZADAS CON SUERO
 ANTI-Cryptococcus neoformans var. gattii

DILUCION DE PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS

	CONC.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
E C P	CONC. +++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
	1:2	+++	+++	++	++	+	+	-	-
	1:4	+++	+++	++	++	+	-	-	-
	1:8	+++	+++	++	+	+	-	-	-
	1:16	+++	++	+	+	-	-	-	-
	1:32	+++	++	+	-	-	-	-	-
	1:64	+++	++	+	-	-	-	-	-
	1:128	++	+	-	-	-	-	-	-
	1:256	+	+	-	-	-	-	-	-

ECP= EXTRACTO CRUDO DE POLISACARIDO

TABLA 8.

TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX
SENSIBILIZADAS CON IgG
ANTI-Cryptococcus neoformans var. gattii

DILUCION DE PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS

	CONC.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
E C P	CONC.+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-
	1:2	+++	++	+	-	-	-	-	-
	1:4	++	+	-	-	-	-	-	-
	1:8	++	-	-	-	-	-	-	-
	1:16	+	-	-	-	-	-	-	-
	1:32	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:64	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-

ECP= EXTRACTO CRUDO DE POLISACARIDO

TABLA 9

**RESULTADOS DE LA TITULACION DE SUERO HIPERINMUNE - LATEX
(DETERMINACION DE LA MINIMA CONCENTRACION DE POLISACARIDO
VAR. GATTII) POR AGLUTINACION.**

NUM.	DILUCION DE ECP	ECP	TESTIGO +	TESTIGO -	LATEX	LATEX
		VAR. GATTII ng/ml			SUERO DIL. 1:2	IgG DIL. 1:2
1	CONC.	4960	+++	-	+++	+++
2	1:2	2480	+++	-	+++	+++
3	1:4	1240	+++	-	+++	++
4	1:8	620	+++	-	+++	+
5	1:16	310	+++	-	++	+
6	1:32	155	+++	-	++	-
7	1:64	77	++	-	++	-
8	1:128	38	++	-	+	-
9	1:256	19	++	-	+	-
10	1:512	9.6	++	-	-	-

TABLA 10.

RESULTADO DE LAS PRUEBAS CRUZADAS

PRUEBA DE AGLUTINACION	SUSP. 2%	DILUCIONES										
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
Ac VAR. NEOFORMANS CONTRA Ag VAR. GATTII	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
Ac VAR. GATTII CONTRA Ag VAR. NEOFORMANS	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-
Ac VAR. NEOFORMANS CONTRA CANDIDA ALBICANS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac VAR. GATTII CONTRA CANDIDA ALBICANS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

V. DISCUSION.

La concentración de carbohidratos que se obtuvo al valorar el extracto crudo de polisacárido es de 6420 ng/ml para la variedad neoformans y 4960 ng/ml. para la variedad gattii concentraciones que fueron adecuadas para las necesidades experimentales de las pruebas de doble difusión y aglutinación. La técnica empleada en la extracción, además de dar buenos resultados es sencilla pues utiliza sólo métodos de filtración. Es importante mencionar que si se requiere de producir mayores cantidades de antígeno, se debe poner especial cuidado en cuanto a las contaminaciones tanto en la cepa pura como en el medio de cultivo seleccionado para éste caso ya que debido a su composición tiende mucho a contaminarse por lo que es recomendable esterilizar adecuadamente y eso depende en gran parte del personal que lo haga. Para comprobar si existía reacción entre el antígeno y el anticuerpo se hizo la prueba de inmunodifusión proporcionando una línea de precipitación bien definida con un título de 1:8 para ambas variedades, mientras que en la prueba de aglutinación con células completas al 2% se obtuvieron títulos en suero de 1:2048 para variedad neoformans y 1:1024 para variedad gattii (tabla 3), la literatura recomienda que se tiene que alcanzar un título de 1:1024 al aglutinar los sueros para que la prueba de aglutinación con látex se desarrolle en forma óptima. En las tablas 6 y 9 los resultados

de las pruebas de sensibilización con látex con suero hiperinmune y con IgG respectivamente fueron realizadas con el extracto crudo de polisacárido, comprobándose que la sensibilidad de las partículas de látex recubiertas con suero hiperinmune anti-Cryptococcus neoformans es mayor que la sensibilidad de las partículas recubiertas con IgG. Por ésta razón la dilución de suero hiperinmune seleccionada para recubrir las partículas de látex fué la de 1:2 para ambas variedades (ver tablas 4, 5, 7 y 8) ya que a ésta dilución se logra detectar 25 ng/ml. de antígeno soluble variedad neoformans y 19 ng/ml. de antígeno soluble variedad gattii. Se puede seleccionar la dilución de 1:4 para ambas variedades, pero no se recomienda pues mientras más diluido sea el suero detecta cantidades menores de antígeno, si se analiza comenzando con la tabla 4 que muestra la titulación de las partículas sensibilizadas con suero anti-Cryptococcus neoformans var. neoformans en la dilución 1:4 de partículas látex sensibilizadas con suero hiperinmune alcanza a detectar una concentración de 100 ng/ml. de antígeno soluble; en la tabla 5 se reporta la titulación de las partículas de látex sensibilizadas con IgG anti-Cryptococcus neoformans var. neoformans en la dilución 1:4 de partículas de látex sensibilizadas con IgG alcanza a detectar una concentración de antígeno soluble de 3200 ng/ml; siguiendo con el análisis y viendo la tabla 7 que reporta la titulación de las partículas de látex sensibilizadas con suero anti-Cryptococcus neoformans

var. gattii, en la dilución 1:4 la prueba da positiva hasta una concentración de antígeno de 77 ng/ml, y por último en la tabla 8, que reporta la titulación de las partículas de látex sensibilizadas con IgG anti-Cryptococcus neoformans var. gattii, en la dilución 1:4 la prueba es sensible para detectar una concentración de antígeno de 1240 ng/ml, dados éstos resultados se optó por elegir la dilución de suero y el tipo de suero que al recubrir las partículas fueran las de mayor sensibilidad. El análisis entre el suero hiperinmune e IgG utilizados en el presente trabajo hace pensar que el fraccionamiento del suero hizo que se perdiera sensibilidad, es decir que con el fraccionamiento se perdieron otro tipo de inmunoglobulinas que favorecen la unión en presencia del antígeno, por tanto en la superficie de las partículas látex y en presencia del antígeno la aglutinación se dió en menor grado; mientras que uniendo las partículas látex con suero sin fraccionar, la superficie de las partículas de látex se van a encontrar cubiertas por todo tipo de inmunoglobulinas entre ellas las IgM que se les ha denominado "aglutininas", siendo su constitución pentamérica aumentan la aglutinación en presencia del antígeno, y además la cantidad de albúmina presente favorece el acercamiento entre las partículas al aumentar la densidad, por lo que se recomienda utilizar el suero sin fraccionar. Además el antígeno seleccionado (extracto crudo de polisacárido) es un carbohidrato que pertenece al grupo de antígenos timoindpendientes, los cuales

provocan una respuesta de anticuerpos por IgM principalmente que son en una proporción de 750 veces más eficiente que las IgG en las pruebas de aglutinación, por lo tanto la diferencia de sensibilidades en los dos tipos de pruebas desarrolladas es bastante evidente ya que la fracción IgG está dirigida en contra de antígenos proteicos. Se utilizó un parámetro de comparación que fué la cantidad mínima de Antígeno detectada por un test comercial: Crypto LA-TEST de Wampole Laboratories, cuya prueba detecta 25 ng/ml. de antígeno, la prueba descrita en el presente trabajo detecta la misma concentración de antígeno que el paquete comercial para variedad neoformans, pero además detecta el antígeno de la variedad gattii a una concentración de 19 ng/ml, es decir que la prueba es sensible en las condiciones en las que se desarrolló. Cabe señalar que en el presente trabajo se realizó por separado las aglutinaciones con ambas variedades de la especie neoformans: neoformans y gattii (ambas patógenas). Con lo que respecta a la especificidad de la prueba, los resultados mostrados en la tabla 10, nos indican que no existen reacciones cruzadas al enfrentar las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos anti-C. neoformans y Cándida albicans la cual sería la levadura más relacionada que tiene importancia clínica en el humano (41), mientras que las pruebas cruzadas entre ambas variedades de C. neoformans si presentan cruces inmunológicos.

Estudios realizados por diversos investigadores demuestran que la variedad gattii está distribuida irregularmente por el mundo. Hernández en (1988), demostró en México que la variedad gattii puede ser aislada con gran frecuencia en casos clínicos (22), aunque hasta la fecha no se ha podido diferenciar por aglutinación las dos variedades debido a que su composición capsular es muy parecida, no está por demás, el realizar la prueba con ambos antisueros (anti-C. neoformans var. neoformans y anti-C.neoformans var. gattii) a una muestra sospechosa de Cryptococcus neoformans.

VI. CONCLUSIONES.

La técnica de aglutinación en látex es sensible para la detección de 25 ng/ml. de antígeno criptococócico var. neoformans soluble en suero y para la detección de 19 ng/ml. de antígeno criptococócico var. gattii soluble en suero, es un método rápido para el diagnóstico de infecciones producidas por éste hongo, y puede ser utilizada junto con otras pruebas de laboratorio, para poder hacer una correlación entre ellas y llegar a un diagnóstico acertado. Es necesario el hacer pruebas de campo para verificar la sensibilidad y especificidad del método en sueros de casos clínicos de positivos a C. neoformans y hacer pruebas de validación con concentraciones conocidas de antígenos en el lugar donde se va a correr la prueba. El presente trabajo ofrece las perspectivas para utilizarse en un futuro, con antígenos y antisueros nacionales sin la necesidad de importar equipos comerciales.

VII. APENDICE.

CALDO GLUTAMINA, GLICINA, ASPARAGINA.

El medio se formula de la siguiente manera:

Glutamina.....	1.0 gr.
Glicina.....	1.0 gr.
Asparagina.....	1.0 gr.
Sulfato de magnesio.....	0.2 gr.
Cloruro de calcio.....	0.1 gr.
Fosfato Acido de sodio hidratado.....	1.0 gr.
Sulfato ferroso.....	0.01 gr.
Glucosa.....	10 gr.
Tiamina.....	0.001 gr.

Se disuelve en 100 ml. de agua destilada y se esteriliza por filtración, se mezcla con 900 ml. de una solución con 6.0 gr. de fosfato ácido de potasio previamente esterilizado en autoclave. Se somete a prueba de esterilidad durante un día, para posteriormente hacer la inoculación de las cepas puras.

METODO DE SANGRADO.

El sangrado de los conejos, se hizo mediante un sistema de vacío y se utilizó el siguiente material:

Una lanceta, un matraz kitasato de 250 ml, una bomba de vacío, diez tubos de ensayo de 7 ml, una gradilla, torundas.

Método:

1.- Se frota con una torunda la vena periférica de la oreja,

se pincha con la lanceta, se coloca la oreja dentro del matraz kitasato previamente conectado a la bomba de vacío, (Debe marcar 5 Lb. de presión); la oreja no debe tocar las paredes del matraz debe quedar bien adaptada la oreja al matraz, por que de lo contrario no se hace un buen vacío y la sangre puede coagular, y no se obtendrá una buena cantidad de muestra.

- 2.- Obteniendo la muestra de sangre se vacía inmediatamente en los tubos de ensayo esto se hace con el fin de recuperar más suero, ya que se vió que dejando la sangre en el matraz se pierde suero.
- 3.- Los tubos con sangre se dejan reposar a 24 horas a 4°C para retraer el coagulo, después se obtiene el suero. Al suero obtenido se le agrega azida de sodio al 0.2% como conservador(29).

PROCEDIMIENTO PARA INMUNODIFUSION DOBLE.

- 1) Disolver 1.5 gr. de agar purificado en 50 ml. de amortiguador veronal caliente (56°C) con azida de sodio ya incorporada al amortiguador.
- 2) Vaciar en cajas Petri grandes (8.5 cm. de diámetro) 10 ml. del medio para cada caja, utilizando una mesa o una tabla nivel.
- 3) Dejar solidificar, para que el agar quede firme, se puede refrigerar por espacio de 5 minutos a 4°C aproximadamente.
- 4) Por cada caja tener 3 patrones y hacer los pozos con

orador.

5) Los patrones se marcan con azul de Alsacia.

6) Los orificios hechos en el agar se llenan con el antígeno (5 mg/ml. de antígeno extracto crudo de polisacárido) (8) de las dos variedades: neoformans y gattii) en el centro y los antisueros (variedades neoformans y gattii) alrededor o viceversa, se recomienda anotar en un papel el esquema seguido.

7) Las cajas se colocan en una cámara húmeda y se incuban a temperatura ambiente 7 días para lograr las líneas de precipitación.

8) Después de los 7 días las placas se retiran de la caja Petri, y se dejan remojando en la solución de amortiguador salino de fosfatos (PBS) por espacio de 24 horas.

9) A las 24 horas, la solución se cambia por PBS limpia.

10) A las 24 horas la solución de PBS se cambia por agua destilada y las placas se dejan por 48 horas.

11) Por último se colocan las placas en planchas de vidrio y se dejan en una estufa para secar. Se tiñen con solución de Negro de Amido.

FRACCIONAMIENTO DE SUERO DE MAMIFERO CON SULFATO DE AMONIO.

Procedimiento:

Esta técnica separa aproximadamente 65% de Gama globulinas, 34% de otras globulinas, y 1% de albúmina.

1) Adicionar un volumen de solución de sulfato de amonio

al 70 %, la solución de sulfato de amonio debe ser igual al volúmen de suero por ejemplo 10 ml. de suero y 10 ml. de solución. La solución saturada de sulfato debe estar a un pH de 5.8, se prepara colocando:

- 1) 55 gr. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puro en 100 ml. en matraz volumétrico de 100 ml. y aforando a 100 ml. con H_2O destilada.
- 2) Para la reacción de la mezcla guardar a 25 °C por un mínimo de 4 horas o a 4 °C por un mínimo de 24 horas. El suero a fraccionar debe precipitarse por centrifugación a 4 °C por 30 min. a una fuerza centrífuga de aproximadamente 1440 gravedades. Decantar y separar el sobrenadante.
- 3) Adicionar agua destilada en el precipitado, agitar durante la adición para obtener una solución de globulina teniendo un volúmen total igual al del suero original (10 ml).
- 4) Reprecipitar la globulina con el método descrito en el paso 1, centrifugar inmediatamente después, separar el sobrenadante y resuspender. (Reprecipitar 3 veces).
- 5) Dializar la globulina con cambios frecuentes de solución de NaCl al 0.85% a pH=8.

Procedimiento para diálisis.

- 1° El precipitado que quedó del paso anterior se resuspende en 10 ml. de agua destilada estéril.
- 2° Esta solución se colocó en membranas para diálisis corte 14000.
- 3° Diálizar con solución salina fisiológica (SSF) (0.85% de NaCl estéril PH=8), cambiar cada 4 horas durante un día.

4° El segundo día de dializado cambiar la SSF dos veces al día.

5° Al tercer día de dializado se cambia la SSF y se hace una prueba con cloruro de bario para verificar si hay o no presencia de sulfato de amonio, ya que debe eliminarse completamente. Por último la SSF se cambia por una solución amortiguadora de Glicina-NaCl pH 8.2 (el amortiguador deberá estar 6 veces mayor al volúmen de la solución a diálizar), es decir si el volúmen que contiene la membrana para diálisis es de 10 ml., el volúmen de amortiguador que debe contener el recipiente donde se sumerjan las membranas llenas es de 60 ml.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- (1) Ajello, L., Georg, K.L., Kaplan, W. and Kaufman, L. (1980). Laboratory Manual for Medical Micology. U.S. Dept. of Health Education and Welfare. Public Health Service Atlanta Georgia. pp. E13-E20.
- (2) Battacharjee, K.A., Kwon Chung, K.J. and Claudemans, C.P. (1978). On the structure of the capsular polysaccharide from Cryptococcus neoformans serotype C. Immunochemistry. 15: 673-679.
- (3) Blandamer, A. and Danishefsky, I. (1966). Investigations on the structure of capsular polysaccharide of Cryptococcus neoformans type B. Biochim. biophys. Acta. 117:305-313.
- (4) Bloomfield, N., Gordon, M.A. and Elmendorf, D.F. (1963). Detection de Cryptococcus neoformans antigen in body fluids by látex particle aglutination. Proc. Soc. Biol. Med. 114:64-67.
- (5) Bonifaz, Alexandro. (1990). Micología Médica Básica. Ed. Méndez Cervantes. Méx. D.F. pp. 305-316.
- (6) Bulmer, S.G. and Nuhan, T.D. (1967). Infectious particle of Cryptococcus neoformans. In recent Advances in Med. and Vet. Mycology. Ed. Kazuo Univ. Park Press Tokio, pp. 56 161-167.
- (7) Chaskes, S. and Tyndall, R.L. (1975). Pigment production by Cryptococcus neoformans from para and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. J. Clin. Microbiol. 1:509-514.
- (8) Cherniak, R., Reiss, E., Slodki, E.M., Plattner, D.R. and

- Blumer, O. (1980). Structure and antigenic activity of the capsular polisaccharide of Cryptococcus neoformans serotype A. Molecular immunology. 17:1025 - 1032.
- (9) Diamond, D. R. (1989). Immune response to Fungal infection. Reviews of infectious. 2, supplement 7. (5): (5)1600- (5)1603.
- (10) Diamond, D.R., May, E.J., Kane, A.M., Frank, M.M. and Bennett, E.J. (1974). The role of the classical and alternative complement pathways in the host defenses against Cryptococcus neoformans. Infection J. Immun. 112 (6):2260-2270.
- (11) Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton, J.A., Reberts, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
- (12) Ellis, D.H. and Pfeiffer, T.J. (1990). Natural habitat of Cryp. neoformans var. gattii. Journal of Clinical Microbiology. 28:1642-1644.
- (13) Emmons, C.W. (1950). Sources of C. neoformans associated with pigeon (Columba livia). Amer. J. Hyg. 62:227-232.
- (14) Evans, E.E. (1950). The antigenic composition of Cryptococcus neoformans. A serologic clasification by means of the capsular and aglutination reaction. J. Immunol. 64:23-430.
- (15) Evans, E.E. and Kessel J.F. (1950) The antigenic composition of Cryptococcus neoformans II. Studies with the capsular polysaccharide. J. Immun. 67:109-114.

- (16) Froomtling, R.A., Shadomy, H.J. (1986). An overview of microphage fungal interaction. Mycopathologia. 93:77-93.
- (17) Fung, Y.S., and Murphy, W. Juneann and Peter. (1982). In vitro Interactions of Immune Lymphocytes and Cryptococcus neoformans. Infection and Immunity. 36(3):1128-1138
- (18) Gadebusch, H.H. (1961). Natural host resistance to infection with Cryptococcus neoformans. The effect of properdin system on the experimental disease. J. Inf. Dis. 109:147-153.
- (19) Goren, B.M. (1967). Experimental Murine Cryptococcosis Effect of Hyperimmunization to Capsular Polysaccharide. The Journal of Immunology. 93(5):914-921.
- (20) Graybill, R.J. and Hague, M. (1981). Passive Immunization in Murine Cryptococcosis. Sabourandia 19:237-244.
- (21) Graybill, R.J. and Mitchell, L. (1980). Treatment of Murine Cryptococcosis With Minocycline and Amphotericin B. Sabourandia. 18:137-244.
- (22) Hernández Gómez Ma. Ruth. Biotipificación de cepas de Filobasidiella (Cryptococcus) neoformans y gattii aislados a partir de casos clínicos humanos. (Tesis) de Licenciatura, Q.F.B. 1988. F.E.S. Cuautitlán, UNAM.
- (23) Hidore, R.M, and Murphy, W.J. (1989). Murine Natural Killer Cell Interactions With a Fungal Target, Cryptococcus neoformans. Infection and Immunity. 57(7): 1990-1997.
- (24) Iwata, K., Yamashita, T., Ohsumi, M. and Baba, M. (1990).

- Comparative morphological and biological studies on the itraconazole- and ketoconazole-resistant mutants of Cryptococcus neoformans. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 28:77-90.
- (25) Kaplan, W., Bragg, L.S., Stanley, C. and Ahearn, G.D. (1981). Serotyping of Cryptococcus neoformans by immunofluorescencia. J. Clin. Microb. 44 (3):313 -317.
- (26) Kozel, R.T. (1983). Dissociation of a hidrophobic surface from phagocytosis of encapsulated and non-encapsulated Cryptococcus neoformans. Infection and Immunity. 39(3):1214-1219.
- (27) Kwon-Chung, J.K. (1982). Improved Diagnostic Medium for separation of Cryptococcus neoformans (Serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var. gattii (Serotypes B and C). Journal of Clinical microbiology. 15(3):535-537.
- (28) Kwong Chung, K.J. and Bennet, J.E. (1984). Epidemiologic differences between the two varieties of C. neoformans. Am. J. Epid. 120 (1):123-130.
- (29) Margni, A.R.. Inmunología e Inmunoguímica Fundamentos. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina, 1982. pp 500-501.
- (30) McManus, J.E. and Bozdech, J.M. (1983). Role of the Latex Agglutination Test for Cryptococcal Antigen in Diagnosis Disseminated Infections With Trichosporon beigelii. The Journal of Infections Diseases. 151(6):1167-1168.
- (31) Morgan, A.M. and Blackstock, A.R. (1983). Modification of

- Macrophage Phagocytosis in murine Cryptococcosis. Infection and Immunity, 40(2):493-500.
- (32) Muchmore, H.G., Felton, F.G., Scott, E.N. (1980). Comparison of enzyme Immunoassay and latex agglutination Methods for detection of Cryptococcus neoformans antigen. Am.J. of Clin. Pathology, 73 (6).
- (33) Murphy, J.W., Mosley, R.L., and Moorhead, J.W. (1983). Regulation of cell mediated immunity in cryptococcosis II. Characterization of first order T suppressor cells (Ts1) and induction of second order suppressor cells. J. Immunology, 130:2876-81.
- (34) Murphy, J.W. and Mosley, R.L. (1985). Regulation of cells mediated immunity in cryptococcosis III. Characterization of second order T suppressor cells (Ts2). J. Immunology, 134:577-84.
- (35) Murphy, W.J., Mosley, R.L., Cherniak, R., Reyes, G., Kozel, R.T. and Reiss, Errol. (1988). Serological, Electrophoretic and Biological Properties of Cryptococcus neoformans Antigens. Infection and immunity, 56(2):424-431.
- (36) Murphy, W.J. (1989). Clearance of Cryptococcus neoformans From Immunologically. Infection and immunity, 57(7):1946-1952.
- (37) Neill, J.M., Abrahams, I. and Kapros, C.E. (1950). A comparison of the immunogenicity of weakly encapsulated strains of Cryptococcus neoformans (*Torula hystolytica*) J. Bacteriol. 59:263-275.

- (38) Polacheck, I. and Kwong Chung, J.K. (1980). Creatinine metabolism in Cryptococcus neoformans and Cryptococcus basillisporus Journal of Bacteriology .42(1):15-20.
- (39) Prevost, E. and Nawell, R. (1978). Commercial Cryptococcal latex Kit. Clinical evaluation in Medical Center Hospital. J. Clin. Microb. B (5):529 -533.
- (40) Rendón Rojas Ma. Cruz Juana. Aislamiento de Cryptococcus neoformans a partir de excreta de paloma y gallina (Tesis) de Licenciatura, Q.F.B. 1986. F.E.S. Cuautitlan, UNAM.
- (41) Rippon, W.J. (1974). The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. W.B. Saunders Company. pp.205-213.
- (42) Rose, R.N., Friedman, H. (1984). El laboratorio en inmunología clínica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina. pp.636-637.
- (43) Salkin, F.I. and Hurd, J.N. (1982). New medium for differentiation of C. neoformans serotype pairs. J. Clin. Microb. 15(1):169-171.
- (44) Scholer, J.H. (1985). Diagnosis of Cryptococcosis and Monitoring of Chemotherapy. Mykosen. 28(1):5-16.
- (45) Shadomy, J.H. and Helie, W. S. (1987). Biochemical Serogrouping of Clinical Isolates of Cryptococcus neoformans. Diagn. Microbiol. infect. Dis. 6:131-138.
- (46) Small, M. J., Mitchell, G.T. and Wheat, W.R. (1986). Strain variation in composition and molecular size of the capsular polysaccharide of Cryptococcus neoformans

- serotype A. Infection and Immunity. 54(3):735-741.
- (47) Staib, Friedrich (1987). Kryptokokkose bei AIDS aus mykologisch diagnostischer sicht. Aids-Forschung (AIFO). 2:363-382.
- (48) Staib, F. and Seibold, M. (1988). Mycological Diagnostic Assessment of the efficacy of Amphotericin B + Flucytosine to control C. neoformans in AIDS patients. Mycoses. 31(4):175-186.
- (49) Stockman, L. and Roberts, D.G. (1982). Specificity of the Latex Test for Cryptococcal Antigen: a Rapid, Simple Method for Eliminating Interference Factors. Journal of Clinical Microbiology. 16(5):965-967.
- (50) Van Cutsem, J., Fransen, J., Van gerven, F. and Janssen, J.P. (1986). Experimental cryptococcosis: dissemination Cryptococcus neoformans and dermatotropism in guinea pigs. Mykosen. 29(12):561-575.
- (51) Wilson, D.E., Bennett, J.E. and Bailey, J.W. (1968). Serologic grouping of Cryptococcus neoformans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127:820-823.