



11661
2
2ej
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**" OBTENCION DE ANTIGENOS DE *Candida albicans*
Y *Cryptococcus neoformans* PARA EL DESARROLLO DE
PRUEBAS DIAGNOSTICAS "**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(AREA: MICROBIOLOGIA)
P R E S E N T A :
MVZ, ENRIQUE SALAS TELLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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.

Dedicatoria

A Adriana:

***Con un por todo agradecí tu apoyo hace tiempo,
con un por todo vuelvo a reconocer, agradecer
y valorar tu amor dispuesto a entender y apoyar
lo que he emprendido.***

Gracias por estar con todo y por todo.

Dedicatoria

A Enrique Arturo:

**Se oía a lo lejos el palpitar de tú corazón
un vientre coraza te mantenía protegido,
no sé si me escuchabas al llamarte?
Hoy toco tú piel mí piel
sé que eres mi pertenencia esmera
tú mirada reflejo de ternura
hace que te diga estas palabras:
tú llanto es aire frío que me cala
sonríe hijo mío que tú palpitar fluye en mi corazón
como torrente inagotable
donde mi vida se da continuación.**



A Caro Segundo:

La identificación entre personas siempre es difícil pero de repente resulta inmediata, ese es nuestro caso y me alegro; me alegro de contar contigo, de saber de una correspondencia e identificación en el cariño, me alegro de que me apoyes sin conveniencia, me alegro de que seamos micólogos y que nos gusten los criptos, me alegro de amalgamarme con tus ideas, pero de lo que más me alegro: es saber que eres mi amiga y que no hay barrera que contra esa fuerza pueda. ÍDEM.

Agradecimientos:

Al Dr. Roberto A. Cervantes Olivares

por la difusión facilitada de sus conocimientos que trascendió por membrana impermeable y colicionó provocando como reacción mi interés de micólogo.

A la Dra. Sara E. Valdés Martínez

por la confianza conferida que me permitió vislumbrar nuevos horizontes y finalizar mi trabajo de tesis.

A mis sinodales:

Sasana Mendoza, Abel Ciprián, Roberto Cervantes, Andrés Romero y Tonatiuh Cruz por sus acertados comentarios y aún más por su invaluable amistad.

A la FES- Cuautitlán:

por el honor de pertenecer a ella, por la sapiencia de sus hombres y mujeres y por ser el regazo donde colmo mis ímpetus de conocimiento.

Indice

Tema	Página
Resumen	i
Lista de Cuadros	ii
Lista de Figuras	iii
1.0. Introducción	1
2.0. Antecedentes (<i>Candida albicans</i>)	5
2.1. Género: <i>Candida</i>	5
2.2. Generalidades	6
2.3. Características estructurales de <i>C. albicans</i>	9
2.4. Patogénesis de <i>C. albicans</i>	11
2.5. Infecciones causadas por <i>C. albicans</i> en humanos.	17
2.6. Diagnóstico	19
3.0. Antecedentes (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	22
3.1. <i>Cryptococcus neoformans</i>	22
3.2. Generalidades	24
3.3. Patogénesis de <i>Cryptococcus neoformans</i>	25
3.4. Infecciones causadas por <i>C. neoformans</i> en humanos	30
3.5. Diagnóstico	31
4.0. Justificación	33

5.0. Objetivos Generales	34
5.1. Objetivos particulares	35
6.0. Material y Métodos	36
6.1. Producción de biomasa	36
6.2. Obtención de antígenos	37
6.3. Determinación de la pureza de los antígenos	38
6.4. Producción de sueros hiperinmunes	39
6.5. Obtención de la fracción globulínica del suero	40
6.6. Sensibilización de partículas de látex	40
6.7. Prueba de aglutinación con partículas de látex	41
6.8. Método espectrofotométrico para evaluar la prueba de aglutinación en látex para el antígeno manana de <i>C. albicans</i>	42
6.9. Pruebas cruzadas	43
7.0. Resultados	44
7.1. Concentración de los antígenos	44
7.2. Pureza de los antígenos	44
7.3. Titulación de Sueros hiperinmunes	44
7.4. Pruebas de aglutinación en látex	45
7.5. Pruebas cruzadas	46
8.0. Discusión	65
8.1. Sobre los resultados de <i>C. albicans</i>	65
8.2. Sobre los resultados de <i>C. neoformans</i>	69
9.0. Conclusiones	72
10. Bibliografía	73

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue de: a) obtener fracciones antigénicas de los hongos *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*, para desarrollar técnicas diagnósticas; b) producir anticuerpos en animales de laboratorio (conejos), con el fin de obtener sueros hiperinmunes para la prueba de detección de antígeno; c) estandarizar técnicas diagnósticas empleando los antígenos obtenidos y los sueros hiperinmunes para la detección de antígeno circulante en ambas enfermedades. Se obtuvo una concentración de carbohidratos de 40.09 µg/ml para las mananas de *Candida albicans* y de 6.42 µg/ml y 4.96 µg/ml para el polisacárido de *Cryp. neoformans* var. *neoformans* y *Cryp. neoformans* var. *gattii* respectivamente. Se sensibilizaron por separado partículas de látex de 0.81 µm con sueros hiperinmunes de ambas levaduras. Los sueros se produjeron en conejos, con diferentes protocolos de investigación a partir de células completas hasta alcanzar un título de 1:1024. Como control negativo se emplearon partículas de látex sensibilizadas con suero hiperinmune de *Dermatophilus congolensis* y como control positivo se utilizaron estuches comerciales contra ambas levaduras. Los resultados obtenidos en el caso del polisacárido de *Cryp. neoformans* en cuanto a la concentración mínima detectada mediante la prueba fue de 25 ng/ml, y 19 ng/ml para sus variedades *neoformans* y *gattii* respectivamente; para la manana de *C. albicans* fue de 15 µg/ml pero cuando se evaluó con el espectrofotometro se llegó a determinar hasta 1 µg/ml. En conclusión podemos mencionar que estas pruebas permiten el reconocimiento de los antígenos en el caso de infecciones sistémicas, dándole un uso diagnóstico como de monitoreo de la enfermedad.

Lista de Cuadros:

Cuadro 1	Incidencia de infecciones micóticas específicas en pacientes con cáncer y trasplante de órganos.
Cuadro 2	Porcentaje de infecciones fúngicas en pacientes con SIDA.
Cuadro 3	Primeros reportes conocidos de los principales tipos de Candidosis.
Cuadro 4	Revisión de la taxonomía actual que afecta los nombres de levaduras de aislamientos clínicos.
Cuadro 5	Nombre de estados perfectos de especies.
Cuadro 6	Mecanismo de adhesión y asociación de <i>Candida albicans</i> .
Cuadro 8	Concentración de los antígenos
Cuadro 9	Concentración de proteínas en los antisueros.
Cuadro 10	Titulos de los antisueros de <i>Candida albicans</i> .
Cuadro 11	Titulo de los antisueros de <i>Cryptococcus neoformans</i> .
Cuadro 12	Titulación de las partículas de látex sensibilizadas con suero anti- <i>Candida albicans</i> .
Cuadro 13	Titulación de las partículas de látex sensibilizadas con IgG anti- <i>Candida albicans</i> .
Cuadro 14	Titulación de las partículas de látex sensibilizadas con suero anti- <i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>neoformans</i> .
Cuadro 15	Titulación de las partículas de látex sensibilizadas con IgG anti- <i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>neoformans</i> .
Cuadro 16	Titulación de las partículas de látex sensibilizadas con suero anti- <i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>gattii</i> .
Cuadro 17	Titulación de las partículas de látex sensibilizadas con IgG anti- <i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>gattii</i> .
Cuadro 18	Concentración mínima detectada mediante diferentes sistemas para la manana de <i>C. albicans</i> .
Cuadro 19	Concentración mínima detectada mediante diferentes sistemas para el ECP del <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> .
Cuadro 20	Concentración mínima detectada mediante diferentes sistemas para el ECP del <i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i> .
Cuadro 21	Datos del método espectrofotométrico para evaluar la prueba de aglutinación en látex de <i>Candida albicans</i> .
Cuadro 22	Resultados de las diversas pruebas cruzadas realizadas para antisueros de <i>Candida albicans</i> y <i>Cryptococcus neoformans</i> .

Lista de Figuras:

Figura 1	Representación esquemática de la manoproteína de la pared celular de <i>Candida albicans</i> .
Figura 2	Espectro de infrarrojo del estándar de mananas de <i>Candida albicans</i> .
Figura 3	Espectro de infrarrojo de las mananas obtenidas de <i>Candida albicans</i> .
Figura 4	Espectro de infrarrojo del estándar del polisacárido de <i>Cryptococcus neoformans</i> .
Figura 5	Espectro de infrarrojo del polisacárido obtenido de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> .
Figura 6	Espectro de infrarrojo del polisacárido obtenido de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> .
Figura 7	Prueba de aglutinación en látex para <i>Candida albicans</i> .
Figura 8	Prueba de aglutinación en látex para <i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>neoformans</i> .
Figura 9	Prueba de aglutinación en látex para <i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>gattii</i> .
Figura 10	Método espectrofotométrico para evaluar la aglutinación en látex del antígeno manana de <i>Candida albicans</i> .

1. INTRODUCCION

Las infecciones fúngicas en el humano ocurren principalmente en el caso de pacientes debilitados donde sus mecanismos normales de defensa están afectados. Los organismos involucrados son hongos cosmopolitas los cuales tienen una baja virulencia inherente. El incremento en la incidencia de estas infecciones y la diversidad de los agentes fúngicos causantes, la presencia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), el desarrollo de cánceres más agresivos, la quimioterapia post-transplantes, el uso de antibióticos y sustancias inmunosupresivas (corticosteroides) ocasionan una disminución de la resistencia del huésped. (Ellis, 1994)

Los factores que predisponen el incremento de la frecuencia o severidad de las infecciones fúngicas son tres:

1) Alteraciones de la barrera epitelial provocada por:

- Una antibioterapia múltiple o de amplio espectro.
- Cateterización permanente.
- Diálisis peritoneal.
- Quemaduras, úlceras, incisión quirúrgica y trauma.
- Incremento en el pH gástrico, citotóxicos y radioterapia.

2) Defectos o disfunción de neutrófilos, fagocitos mononucleares y otros granulocitos causadas por:

- Radioterapia.
- Quimioterapia.
- Anemia aplásica.
- Enfermedad granulomatosa crónica.
- Diabetes Mellitus.

3) Defectos o disfunción de inmunidad mediada por linfocitos -T causados por:

- **SIDA.**
- **Enfermedad de Hodgkin.**
- **Transplantes.**
- **Quimioterapia.**
- **Radioterapia.**
- **Leucemia.**
- **Corticosteroides.**

En pacientes neutropénicos virtualmente cualquier hongo puede crecer a 37 C y ganar el acceso al torrente sanguíneo causando una infección diseminada. De hecho, la trilogía de la neutropenia, el daño mucosal inducido por la quimioterapia y el uso de drogas antibacterianas de amplio espectro ocasiona la remoción de la flora normal que es la causa de infecciones fúngicas, especialmente Candidosis, en estos pacientes. (Cuadro 1). Estas infecciones ocasionan un enorme problema en terminos del reconocimiento clínico inicial, el diagnóstico y la identificación en el laboratorio del agente causal. La prevalencia de infecciones micóticas serias en pacientes neutropenicos se incrementa constantemente, siendo de relevante importancia la Candidosis sistémica.

Cuadro 1. Incidencia de infecciones micóticas específicas en pacientes con cáncer y transplante de órganos.

Candidosis	44 - 80 %
Aspergilosis	20 - 30 %
Zigomicosis	Rara
Criptococosis	Rara
Histoplasmosis	*Rara
Coccidioidomicosis	*Rara
Hialohifomicosis	Rara

* Areas Endémicas

Ellis, 1994

La aparición del SIDA ha provocado un aumento en la presentación de enfermedades micóticas (Anderson and May, 1992; Clement, 1994). Según el boletín semanal de la Organización Mundial de la salud, con fecha del 2 de Marzo de 1990, desde la aparición de la enfermedad hasta ahora, se han reportado 222 740 personas con SIDA en el mundo entero; 31 581 provienen de Europa (14.17 %), 588 de Asia (0.22 %), 147 159 (66.06 %) de America, 41 518 de Africa (18.63 %) y 1 894 de Oceanía (0.84 %).

Al respecto México ocupa el número 11 a nivel mundial y es el tercer lugar en el continente americano con 3944 casos, detrás de Brazil (9 555) y de Estados Unidos de Norteamérica (121 645).

En cuanto a la Mortalidad, de los 3944 casos registrados hasta la fecha en México, se han reportado 2 080 personas aún vivas (52.7 %) y 1 586 fallecidas (40.2%). Se ignora la suerte de 278 enfermos (7%).(Carrillo, 1990).

El Cuadro 2., muestra las diferentes micosis que afectan a los pacientes con SIDA.(Ellis, 1994).

Cuadro 2 . Porcentaje de infecciones fungales en pacientes con SIDA

Candidosis Oral	40- 90 %
Candidosis esofágica	50 %
Criptococosis	3 - 33 %
Histoplasmosis	* 5 - 30 %
Coccidioidomicosis	* Rara
Aspergilosis pulmonar	5 %
Esporotricosis cerebral	Rara
Hialohifomicosis	Rara
Dermatofitosis	20 - 90 %

* Areas endémicas
Ellis, 1994

El SIDA, ha sido responsable de un drámatico incremento en infecciones causadas por hongos levaduriformes como *Candida* y *Cryptococcus*, el porcentaje de prevalencia de ambas enfermedades, así como el número creciente de individuos afectados por el SIDA han aumentado el interés en el estudio de los agentes etiológicos implicados en Candidosis y Criptococosis, siendo a su vez necesarias las investigaciones que desarrollen metodologías para su adecuado diagnóstico.

2. ANTECEDENTES

2.1. Género: *Candida*

La historia de las enfermedades causadas por *Candida* se reconocen desde los principios de la microbiología. Siendo introducida en 1751 en la clasificación de algunos hongos aislados de la vegetación, con el género *Monilia*, el cual se asocio con el algodoncillo a fines del siglo XIX. Plaut, en 1887, aislo de la madera un hongo semejante a una levadura, el cual recordaba al algodoncillo oral en traqueas de pollos; fue así, que considero a su aislamiento identico a *Monilia candida* y en 1890 Zopf, nombro al hongo del algodoncillo como *Monilia albicans*, este nombre permaneció por varias decadas, derivándose después el nombre de moniliasis, el cual describía a las afecciones causadas por el hongo del algodoncillo (Odds, 1979).

El descubrimiento inicial del algodoncillo "trush" fue reportado por Langenbeck en 1839 cuando demostró la presencia de un hongo levaduriforme en las lesiones de aftas bucales en un caso de tifo, aunque erroneamente lo nombro el agente causal de esta enfermedad. En 1846 Berg, fue el primero en describir completamente la relación entre el hongo y las lesiones bucales. En 1892 D. Gruby describió ante la Academia de Ciencias de Paris al hongo responsable del verdadero algodoncillo en los niños y colocó al hongo de Langenbeck en el género *Sporotrichum*; para 1853 Robin lo denominó *Oidium albicans* siendo el primero en utilizar el nombre albicans para esta especie. En 1868 Quinquad propuso el nombre *Syringospora robinii* y en 1877 Reess nombro al hongo *Saccharomyces albicans* (Rippon, 1982).

La posición taxónomica de *Candida* fue esclarecida en 1923 por Berkhout, quien sugirió el nombre generico de *Candida*, el cual fue adoptado formalmente a nivel internacional.

En 1984 se enlistaron en el género *Candida* 196 especies (incluyendo aquellos previamente en el género *Torulopsis*); menos de 20 de estas especies han sido recuperadas de situaciones patológicas bien documentadas (Chaparro, 1993).

A Wilkinson (1849) se le acredita la primer descripción de la candidosis vaginal y su etiología micótica y Haussmann demostró en 1875 que el agente causal del algodoncillo oral y vaginal era el mismo microorganismo. La primer descripción completa de otras formas superficiales de candidosis no apareció hasta los primeros años del siglo XX, aunque es probable que la candidosis cutánea haya sido conocida clínicamente mucho antes (Smith, 1989). La primera descripción de candidosis profunda, fue hecha por Zenker en 1861, en un caso de infección cerebral; en 1877 Parrot, describe al hongo en una infección pulmonar y en un caso de infección diseminada fue descrito en 1890 por Schmorl. Más tarde, Castellani hizo investigaciones extensivas de las micosis a principios de este siglo, el fue el primero en sugerir que las especies de levaduras involucradas en la patogenesis de la candidosis son otras distintas a la *Monilia albicans* (Odds, 1979). El Cuadro 3 resume las diferentes formas de la candidosis y a quién se le acredita su reconocimiento. (Odds, 1979)

2.2. GENERALIDADES

Candida es un hongo dimórfico, como levadura se considera comensal del tracto gastrointestinal de individuos sanos y probablemente sea la levadura más importante por la frecuencia de su presentación (Ashman, et al., 1990). Son varias las especies de *Candida* que pueden estar etiológicamente involucradas en la Candidiasis, la más común es *C. albicans* y raramente *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* (*C. pseudotropicalis*) y *C. (Torulopsis) glabrata*. En el cuadro 4 se describe en forma sucinta el nombre antiguo y el nombre actual de las principales especies de *Candida* de importancia médica. (Odds, 1988)

Cuadro 3.

**PRIMEROS REPORTE CONOCIDOS DE
LOS PRINCIPALES TIPOS DE
Candidosis**

TIPO DE LESIONES CAUSADAS POR <i>Candida</i>	Fecha de la primera acreditación	Autor
Algodoncillo oral	4th. A.C.	Hipócrates
Osea	1835	Verón
Vaginal	1849	Wilkinson
Cerebral	1862	Zenker
Diseminada	1890	Schunori
Onicomycosis	1904	Dubendorfer
Cutánea	1907	Jacobi
Mucocutánea crónica	1909	Forbes
Artritis	1921	Goldring
Paroniquia	1925	Kingery y Thienes
Cistitis	1927	Rafin
Osteomielitis	1928	Connor
Nefritis	1931	Lunquist
Endocarditis	1940	Joachim y Polayes
Endoftalmitis	1943	Miale
Corioamnionitis	1958	Benershke y Raphael

Odds, 1979.

Cuadro 4.

**REVISION DE LA TAXONOMIA ACTUAL QUE AFECTA LOS
NOMBRES DE LEVADURAS DE AISLAMIENTOS CLINICOS**

<i>NOMBRE ANTIGUO</i>	<i>NOMBRE ACTUAL</i>
<i>Candida brumptii</i>	<i>Candida catenulata</i>
<i>Candida claussenii</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida parakrusei</i>	<i>Candida parapsilopsis</i>
<i>Candida paratropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>Candida ravautii</i>	<i>Candida catenulata</i>
<i>Candida stellatoidea</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Torulopsis candida</i>	<i>Candida famata</i>
<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>

Odds, 1988.

Candida albicans forma parte del reino Fungi u hongo, phylum Deuteromycota, clase Blastomycetes, familia Cryptococcaceae y género *Candida* (Campos,1991).

El género *Candida* esta integrado por hongos unicelulares (levaduras) como fase predominante y por algunas especies que pueden llegar a presentar una fase pluricelular (micelio verdadero), pasando por una etapa intermedia denominada tubo germinativo (Segundo,1991).

Las levaduras son células ovales Gram positivas que miden de 2 a 8 μm por 2.5 a 20 micras, según la especie, son aeróbicas cuya división es por gemación y en el medio de cultivo presentan colonias cóncavas, cremosas, de color blanco ó café según sea el medio empleado. Este género es capaz de formar una fase pseudomicelial la cual es un conjunto de blastosporas que dan la apariencia de un micelio que mide de 5 a 10 μm de diámetro con puntas redondeadas que se mantienen unidas como los eslabones de una cadena.

Dentro del género *Candida* algunas especies presentan reproducción sexual.(Odds, 1988) (Cuadro 5).

Las principales características de *Candida albicans* son:

- a) La habilidad para producir filamentos cortos llamados tubo germinativo, ha sido la prueba tradicional específica para identificar a *C. albicans* ya que ésta los produce en un tiempo de 1 a 2 horas.
- b) La capacidad de desarrollar estructuras esféricas refringentes denominadas clamidosporas, que son producidas solo por *C. albicans* y en casos muy raros por *C. tropicalis*.
- c) El crecimiento a diferentes concentraciones de ácido, ya que *C. albicans* crece en pH menor a 1.5, mientras que otras especies de *Candida* no son capaces de hacerlo. (Odds and Abbott, 1980)

Candida no solo puede presentarse como blastospora y pseudohifa, sino también como una hifa verdadera con formación de clamidosporas (Odds,1979).

Cuadro 5.

**NOMBRE DE ESTADOS PERFECTOS DE ESPECIES
DE *Candida*
AISLADAS EN CASOS CLINICOS**

NOMBRE DE LA FORMA ASEXUAL	NOMBRE DE LA FORMA SEXUAL
<i>Candida famata</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Candida guillermundii</i> (var. <i>guillermundii</i>)	<i>Pichia guillermundii</i>
<i>Candida guillermundii</i> (var. <i>membranaefaciens</i>)	<i>Pichia ohmeri</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida Krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>

Odds, 1988

En 1961, Hansaslever y Mitchell describieron el primer método para tipificar a *Candida albicans*. En la actualidad se sabe que este método está basado en las diferencias en el tipo y extensión de las ramificaciones de manosa de la levadura, el método define principalmente dos serogrupos, A y B. (Odds, 1988).

Posteriormente, Fukazawa, Kano y Suzuki desarrollaron un esquema de identificación de levaduras basado en los patrones de aglutinación con antisueros de referencia y monoespecíficos y por fermentación y asimilación de glucosa. La aglutinación de *Candida albicans* por uno de los 10 antisueros, el antisuero 6 (IF6), se ha reportado que puede diferenciar el tipo A del tipo B. Recientemente, algunos grupos han reportado la aglutinación de *C. albicans* por anticuerpos monoclonales que se correlacionan con el serotipo (Miyakawa, et al., 1986; Sundstrom, et al., 1988).

Estudios en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) y en Europa, realizados entre 1961 y 1981, demostraron que el serotipo prevalente aislado en pacientes con enfermedad producida por *Candida* fue el tipo A (65-95%) (Brawner and Cutler, 1989). En 1982, en un estudio realizado aislando *C. albicans* de pacientes con enfermedad no especificada, se demostró que el tipo A y el B se presentaban en un 50.7% y 49.3% respectivamente (Stiller, et al., 1982). Recientemente se ha encontrado que individuos inmunocompetentes eran igualmente propensos a tener aislamientos tipo A o B como flora oral, pero que individuos inmunocomprometidos, incluyendo pacientes con SIDA eran casi dos veces más propensos a estar infectados con el tipo B (Brawner and Cutler, 1989). En la actualidad debido a trabajos realizados en EUA, Europa y África resulta real el incremento de la prevalencia del tipo B, principalmente en pacientes con SIDA (Schmid, et al., 1990).

2.3. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE *Candida albicans*:

La pared celular presenta tres funciones principales:

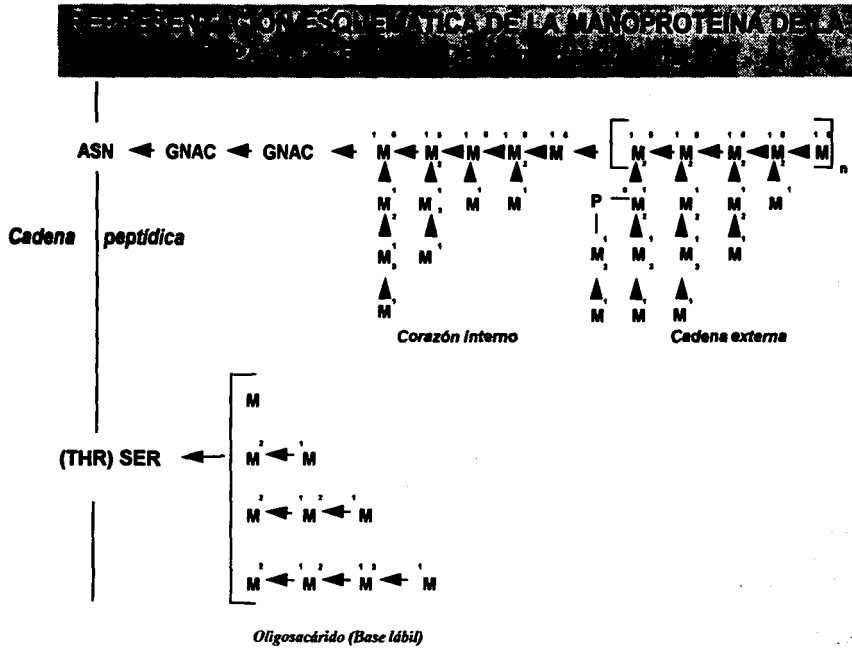
- a) Mantiene la forma celular,
- b) Secreta enzimas hidrolíticas y
- c) Es el punto de contacto entre el hongo y su medio.

En el estudio de la pared celular, se han encontrado diferencias cualitativas y cuantitativas entre las células levaduriformes y miceliales durante el ciclo de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Además, se han observado cambios dinámicos en la superficie celular durante la formación del tubo germinativo, incluyendo síntesis y degradación rápidas de las manoproteínas de la superficie. La pared celular representa aproximadamente el 30% del peso total de la célula, esta constituida por manoproteínas (20-30%); glucanas con enlace 1-3 (25-35%), glucanas con enlace 1-6 y pequeñas cantidades de quitina (0.6-2.7%), proteína (5-15%) y lípidos (2-5%).(Cherniak, et al., 1980).

La Figura 1, es un diagrama esquemático que muestra la arquitectura, composición y organización de la manoproteína de la pared celular de *Candida albicans*. (Arnold, 1981).

Características de los componentes de la pared: La superficie más externa de *C. albicans* también denominada capa mucosa, tiene un papel muy importante dentro de la patogenicidad, fagocitosis y adherencia. El principal componente de esta capa es la manoproteína, aunque esta la podemos encontrar distribuida en zonas de alta densidad electrónica y en la cubierta fibrilada de la pared (Calderone and Braun, 1991) . Aunque aún no se conoce con precisión las estructuras que funcionan como inmunodeterminantes específicos, si se sabe que las cadenas laterales de las manoproteínas contienen los epítopes que confieren la seroespecificidad; sobre todo al provocar cambios fenotípicos en la superficie de la pared, causados por diferentes arreglos en las manoproteínas expresadas (Martinez, et al., 1990; Gil, et al., 1991).

Figura 1.



Abreviaciones: M= manosa, GNAC= N-acetilglucosamina, ASN= asparagina, SER= serina, THR= treonina, y P= grupo fosfodiéster.

Arnold, W.A. (1981)

La estructura de las manoproteínas de *C. albicans* es similar a la de *Saccharomyces cerevisiae* y las composiciones de la pared celular de la levadura y de la hifa son relativamente semejantes, sin embargo, las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas han sido ampliamente discutidas (Ashman, et al., 1990; Torosantucci, et al.,1990), concluyéndose que levaduras e hifas son diferentes en cuanto a la composición de mananas. En resumen, la diferencia consiste en un decremento en la longitud promedio de la cadena de manooligosacáridos en las mananas de las hifas en comparación con las de la levadura, dicho decremento se atribuye a una menor actividad de la enzima manosil transferasa en la forma de hifa que en la levadura (Saxena, et al.,1990; Torosantucci, et al.,1990). La principal porción de la manoproteína esta compuesta de polimánosa altamente ramificada unida a la proteína a través de un puente de quitobiosa y asparagina. Es así, que el modelo estructural señala que el oligosacárido se encuentra unido covalentemente a la proteína ya sea como pequeños oligosacáridos unidos por enlaces tipo O (vía residuos de treonina o serina) o como un complejo oligosacárido mayor unido por enlaces N que involucran dos unidades de N-acetil-D-glucosamina y residuos de asparagina (Calderone and Braun, 1991); siendo las manoproteínas-O menos complejas que las manoproteínas-N. Por lo que respecta a la manana, se ha demostrado que contiene principalmente residuos de manopiranososa unidos por enlaces alfa (1-6) y alfa (1-2). Los residuos de manosa unidos por enlaces alfa (1-6) forman una cadena que esta altamente sustituida por cadenas cortas de olimánósidos que contienen uniones internas alfa (1-2) y en menor cantidad uniones alfa (1-3).(Martinez, et al., 1990).

Un estudio de iodación vectorial demostró que la principal manoproteína de la superficie, es un polímero de 260 KDa compuesto por 1.5% de proteína y 98.4% de hexosa (Reiss et al.,1992).

Otros polímeros de la pared celular de *C. albicans* son: las glucanas que imparten fortaleza estructural y se pueden encontrar en tres diferentes formas β glucana (union 1-6)

ramificada, β glucana (unión 1-3) ramificada y β glucana (1-3)- β (1-6) mezclada insolublemente con la quitina formando un complejo (Reiss et al.,1992). Las proporciones en que aparecen las diferentes glucanas varía entre las formas de levadura y de tubo germinal (Casanova, et al.,1989; Calderone and Braun, 1991).

Estudios realizados han revelado que *Candida albicans* presenta una membrana típica de células eucarióticas. Los análisis de la composición química de la membrana muestran a las proteínas y a los lípidos como sus principales componentes, con pequeñas cantidades de carbohidratos y ácidos nucleicos (Odds,1979).

La membrana es importante en el control homeostático y es el blanco de los agentes antimicóticos. También, se ha demostrado su importancia en la síntesis de las capas de la pared celular y en la expresión de los antígenos de superficie. A pesar de las profundas diferencias entre la membrana y la pared celular de *C. albicans*, se han encontrado ciertos epitopes compartidos por ambas estructuras a diferentes tiempos de crecimiento, tanto en la blastoconidia como en el tubo germinal (Li and Cutler, 1991).

2.4. PATOGENESIS DE *Candida albicans*

Son varios los estudios realizados para definir los mecanismos patogénicos de *C. albicans*, siendo la complejidad de factores de virulencia frente al hospedador son los que le permiten causar la enfermedad (Calderone and Braun, 1991).

La adhesión de *C. albicans* a los tejidos del hospedador y su implantación en biomateriales, se ha considerado un paso temprano para el establecimiento de la enfermedad. La asociación y adhesión a mucosas de varias superficies de tejidos por parte de *C. albicans* es compleja, procesos multifactoriales no pueden ser completamente descritos empleando términos sencillos como adhesión o invasión. Varios pasos parecen ocurrir de manera secuencial antes de que la adhesión se establezca. (Kennedy, et al., 1992).

Para que *C. albicans* pueda adherirse *in vivo* se requieren los siguientes pasos:

- (i) acercarse a la superficie;
- (ii) superar la fuerzas fisicoquímicas del límite de la capa hidrodinámica;
- (iii) penetrar (activa o pasivamente) la interface liquido-sólido;
- (iv) adsorberse a la superficie o a las macromoléculas de la superficie y finalmente;
- (v) atacar vía específica las interacciones adhesina-receptor.

El hongo estará libre para multiplicarse en la superficie o intracelularmente una vez que la penetración de la capa epitelial haya ocurrido. El Cuadro 6 presenta un resumen de los mecanismos de adhesión y asociación de *Candida albicans* (Marrie and Costerton, 1981).

La adherencia a las superficies celulares es por lo tanto un factor de virulencia importante que es mayor en *C. albicans* que en otras especies como *C. tropicalis*. El componente proteico de la manoproteína encontrado en la capa externa fibrilar de *C. albicans* (Critchley y Douglas, 1987), así como la hidrofobicidad de otras especies, parece importante en la adherencia (Douglas, 1987). El papel de otros factores tales como pH, CO₂, azúcares, permanecen menos claros en comparación a lo que se conoce en bacterias.

La adhesión a células epiteliales bucales disminuye en presencia de algunos agentes antifúngicos; fenómeno probablemente relacionado con la inhibición de la formación del tubo germinal. Se ha sugerido la existencia de un factor que une al fibrinógeno fuertemente con la superficie de los tubos germinales e hifas como un determinante de la patogenicidad de *C. albicans* (Bouali et al, 1987); en una idea similar, la capacidad de las levaduras para unirse a la fibronectina se ha sugerido como un factor de virulencia al menos en la endocarditis (Calderone et al., 1987).

Adicional a la adhesión a células epiteliales y superficies inertes, el significado ecológico y patológico de la co-adhesión de *C. albicans* a otros microbios pegados a las superficies mucosas todavía no es tan claro y puede ser importante en el inicio de lesiones en mucosas (Kennedy et al., 1987).

Cuadro 6.

MECANISMO DE ADHESION Y ASOCIACION DE *Candida albicans*

MECANISMO	ACTIVO O PASIVO	ESPECIFICO O NO ESPECIFICO	DIRECTO O INDIRECTO	EJEMPLOS
ADHESION NO ESPECIFICA	A, P	N	D, I	INTERACCIONES HIDROFOBICAS CON PLASTICOS, PUNTES IONICOS CON ACRILICO, ADSORCION A INTERFACES
INTERACCIONES ADHESINA-RECEPTOR	A	E	D, I	ADHESION A CELULAS EPITELIALES. UNION A FIBRINOGENO O COMPLEMENTO. ADHESION A CELULAS FAGOCITICAS DE LA ZONA MARGINAL DEL BAZO.
COAGREGACION Y COADHESION A ORGANISMOS ADHERENTES	A	E, N	I	FORMACION DE MICROCOLONIAS EN PLACAS DE TEJIDO, FIJACION A BACTERIAS O LEVADURAS ADHERENTES.
ATRAPADO EN TEJIDO	P	N	D	ATRAPADO EN GEL MUCOSA O CAPAS DE TEJIDO DE LA MUCOSA INTESTINAL.
PENETRACION DEL TUBO GERMINAL	A	E, N	D, I	PENETRACION DEL TUBO GERMINAL E HIFA A LAS SUPERFICIES DE LA MUCOSA ORAL. PENETRACION DE LA HIFA A LA REGION QUERATINIZADA DEL ESTOMAGO.
PRODUCCION DE ENZIMA	A	E, N	D	DIGESTION EXTRACELULAR DEL EPITELIO ORAL O GEL DE LA MUCOSA INTESTINAL Y CAPA DE LAS MICROVELLOCIDADES DEL INTESTINO DELGADO.

A= Activa; P= Pasiva; E= Especifico; N= No especifico; I= Indirecto; D= Directo

Marrie and Costerton, 1981

Existen varias opiniones entre los investigadores en relación al estado portador de *C. albicans* en los principales sitios de su actividad comensal: boca, vagina e intestinos (Odds, 1979). La población en estudio y el procedimiento de muestreo empleado (uso de procedimientos de enriquecimiento en comparación con sembrado directo en placa) son dos de los factores contribuyentes más obvios a este dilema (Kiehn et al., 1980). Por regla general, *C. albicans* puede recuperarse de la cavidad oral alrededor del 10% de la población normal; cifra que se incrementa a más del 75% en pacientes hospitalizados (Odds, 1979), alcanzando 20% en la piel de pacientes hospitalizados.

El estado de portador oral puede estar influenciado por el grupo sanguíneo (más alto en O) y por no secretar antígenos del grupo sanguíneo. Además, se ha sugerido que llevar a *C. albicans* en la cavidad oral puede influir, o estar influido por, mecanismos regulatorios de Linfocitos T. (Melbye et al., 1985).

Mientras algunos autores consideran que *C. albicans* no es un comensal normal de la vagina, la mayoría estaría de acuerdo que puede encontrarse en la ausencia de enfermedad evidente en más del 10 % de las mujeres no embarazadas. Esta incidencia aumenta a más del 50% en situaciones bien definidas donde el contenido de glucógeno de la superficie de la mucosa permanece elevado (ej. durante el embarazo). La vulvovaginitis causada por *Candida* es indudablemente una de las enfermedades infecciosas más comunes en mujeres en edad de crianza de niños (Hurley and De Louvois, 1979).

Bajo situaciones apropiadas, ocurre la diseminación a partir de lesiones en las mucosas o bien por aumento en la población de levaduras presentes a nivel intestinal inducido por una terapia prolongada de antibióticos y puede resultar en el advenimiento de enfermedad invasiva diseminada. La eliminación de los anaerobios intestinales, especialmente en la presencia de inmunosupresión (ej. medicación con ciclofosfamida) parece significativa. Experimentos en ratones han revelado que en tales circunstancias *C. albicans* se asocia con la mucosa cecal por lo menos por 4 mecanismos distintos: adhesión al epitelio,

adhesión al moco, coadhesión a otras levaduras y bacterias adherentes, y atrapamiento en el gel mucosa que esta bajo el epitelio (Kennedy et al,1987). Si se extiende o no el agente causal, dependerá del número de levaduras desarrolladas en el intestino lo que resultará en el desarrollo de enfermedad diseminada, lo cual dependerá a su vez de la capacidad de los neutrófilos para inhibir el crecimiento fungal subsecuente.

Las células levaduriformes (blastoconidia) aparentemente son las causantes de lesiones profundas localizadas, aunque la formación de tubo germinal proporciona ventajas para la multiplicación del hongo (Klotz, et al 1983). Estudios experimentales sugieren que ambas formas, levaduriforme e hifa de *C. albicans* pueden invadir y proliferar en tejidos apropiados (Sheperd, 1985).

Mientras la actividad linfocítica normal (y de los macrófagos) favorece la resolución de las lesiones, cantidades adecuadas de células fagocíticas funcionalmente activas, especialmente neutrófilos, parecen importantes en la prevención de la diseminación de los hongos y la proliferación durante episodios fungémicos, encontrándose que aún en ausencia de linfocitos T funcionales y una biota bacteriana viable, los ratones atímicos que se colonizan con *C. albicans* son resistentes a una candidosis diseminada (Lee and Balish,1983).

Una vez que *Candida* penetra en el torrente sanguíneo, el principal mecanismo de defensa se relaciona con la actividad de los leucocitos polimorfonucleares (Nugent and Onofrio,1984), y ocurriendo un marcado progreso y diseminación de la infección en ausencia de un número adecuado de neutrófilos (ej. en neutropenia), ó retardo en su movilización (ej. en presencia de agentes anti-inflamatorios como corticosteroides), ó malfuncionamiento de la actividad fagocítica normal (ej.en presencia de bajos niveles de complemento).

La problemática sobre las causas de la diseminación de *Candida*, resulta al saberse que siendo los neutrófilos esenciales para limitar la diseminación invasiva y la demostración

aparente de la poca habilidad de estas células para matar blastoconidias ingeridas, al menos *in vivo*, ha sugerido que deben ocurrir mecanismos de daño al neutrófilo, diferentes a la fagocitosis normal. Esto es probablemente cierto ya que experimentos de laboratorio han demostrado claramente que los elementos hifales son dañados y/o muertos por los neutrófilos, presumiblemente por la liberación extracelular de constituyentes lisosómicos, de los cuales parecen importantes el sistema de mieloperoxidasa, metabolitos tóxicos del oxígeno y posiblemente péptidos catiónicos, en donde los corticosteroides pueden inhibir esta actividad un poco (al menos con células fagocíticas mononucleares). Es así, que los corticosteroides pueden actuar en uno de varios caminos retardando la movilización de los leucocitos e inhibiendo la actividad fagocítica (Diamond,1977) además de interferir con los mecanismos inmunes, mientras que el papel de los macrófagos en la protección contra la infección se desconoce. Actualmente, se ha sugerido que *C. albicans* puede inducir/atraer a los linfocitos killer naturales (NK). Aunque el papel antifagocítico de los receptores de superficie de *C. albicans* para fragmentos opsonizados del complemento (ej. iC3b) todavía necesita ser totalmente elucidado. (Marconi et al.,1985).

El papel de los antibióticos de amplio espectro como factor contribuyente en el establecimiento de lesiones por *Candida* en mucosas es bien sabido y aceptado (Odds, 1979) y parece lógico asumir que esto contribuye al desarrollo de fungemia y enfermedad invasiva en neonatos y después de cirugía mayor (especialmente intraabdominal) permitiendo el sobrecrecimiento de la levadura en el tracto digestivo, seguida de candidemias transientes. Así mismo la eliminación de anaerobios del intestino y no de los coliformes y otras bacterias aerobias, parece significativo (Kennedy, et al.,1987). Por otra parte se ha demostrado que *Candida* es un colonizador/invasor frecuente de úlceras gástricas y puede obviamente colonizar áreas de trauma gastrointestinal menor en individuos normales y en contraste con la mayoría de las bacterias, las especies patógenicas de *Candida*, no se han caracterizado por tener factores dominantes de

virulencia. Sin embargo, el reconocido orden de virulencia de las especies de *Candida* en humanos, con *Candida albicans* considerada como la principal, seguida de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilopsis* y *Candida (Torulopsis) glabrata*, presentan factores de virulencia discretos que las distinguen de otras especies de levaduras que también crecen a 37 C y son ocasionalmente aisladas de especímenes clínicos. Entre otros factores potenciales de virulencia para *Candida*, se encuentra la proteólisis celular, la cual ha tomado mucha relevancia en los últimos años y fue descrita primeramente por Staib en 1965; una alta actividad proteolítica extracelular, la cual es causada por la enzima aspartil proteasa (CAP) (E.C.3.4.23.6). Dicha enzima ha sido purificada de medios de cultivo de varias cepas de *C. albicans*, tiene un rango molecular de 42 000-45 000 es un ácido carboxil proteinasa con un espectro de sustratos específicos donde se incluye a la queratina epitelial, el colágeno de la dermis, albumina, hemoglobina, inmunoglobulinas de cadenas pesadas y las proteínas de la matriz extracelular; tienen un rango de actividad a pH 2.0-7.0 con un pH óptimo entre 2.5-4.5, dependiendo del sustrato.(Rüchel, et al., 1992).

El CÁP es expresado por *Candida albicans* después de la fijación de la levadura al epitelio del hospedador *in vitro* (Borg and Rüchel, 1988), localizándose esta enzima en pacientes que sufren vaginitis causada por *Candida*. El antígeno del CAP se ha demostrado consistentemente por inmunofluorescencia en especímenes de mucosa en casos de algodocillo y en lesiones en piel durante candidosis diseminada (Rüchel, et al., 1992). Anticuerpos específicos contra el CAP se han detectado en suero humano, particularmente con altos títulos en pacientes que sufren candidosis invasiva (MacDonald and Odds, 1980).

La alta actividad proteolítica ha sido también establecida *in vivo* para la mayoría de los aislamientos de *C. tropicalis* y *C. parapsilopsis*, y en menor grado para *C. glabrata*. Siendo *Candida parapsilopsis* y *Candida glabrata* consideradas como proteolíticas por

algunos autores, sin embargo, ambas especies causan raramente infección localizada profunda. *C. glabrata* produce solo pequeñas cantidades de proteasa extracelular. Aunque se encuentra reportado un CAP con peso molecular de 33,000 para *C. parapsilopsis*, existe también evidencia que *C. parapsilopsis* no produce CAP durante episodios de fungemia. Aún *in vitro*, la inducción de la secreción de CAP en estas especies puede requerir usualmente de altas concentraciones de glucosa (Rüchel et al., 1976).

Estudios de otros aislamientos indican que probablemente otras enzimas (fosfolipasa A, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa transilasa) juegan un papel importante en la patogenicidad de *C. albicans* (Thomas, 1986), varios trabajos, señalan la presencia de una enzima de 47 KDa (Casanova et al., 1991; Franklyn et al., 1990; Zöller et al., 1991) tanto en citoplasma como en la pared celular de las formas miceliales y levaduriformes de *C. albicans*, proteína se ha caracterizado como una enzima glucolítica enolasa (Franklin et al., 1990). Dicha enzima se ha encontrado circulando en la sangre de pacientes con infección sistémica por *C. albicans*, razón por la que se ha dado gran atención al empleo de este antígeno, para el desarrollo de una prueba de detección de anticuerpos específicos (CANDTEC) que intenta mejorar el serodiagnóstico de estas infecciones (Zöller et al., 1991).

2.5. INFECCIONES CAUSADAS POR *C. albicans* EN HUMANOS

Debido a que *C. albicans* es un oportunista y virtualmente se encuentra presente en todos los seres humanos desde su nacimiento, está en una posición ideal para tomar ventaja de cualquier debilidad de su hospedador y provocar un aumento en su colonización dando origen a una infección (Brawner and Cutler, 1989).

Las infecciones por *C. albicans* se pueden manifestar en diferentes grados de severidad, que van: desde un problema superficial de piel, una infección crónica de las uñas, una

enfermedad de cavidad oral, garganta o vaginal hasta una infección sistémica, la cual se puede dividir en a) Candidemia, b) infección sistémica y c) infección invasiva focal.

Candidemia se considera cuando uno o más hemocultivos resultan positivos a *Candida* spp. a una temperatura oral igual o superior a 38 C. Infección sistémica se define como la evidencia histológica de la invasión a tejidos por *Candida* spp. en dos o más órganos; la infección invasiva focal es aquella en donde la presencia histológica de *Candida* spp. se demuestra en un sólo órgano (pulmón, corazón ó riñon) (Phillips, et al., 1990).

Con el incremento de las modalidades terapéuticas para el cuidado de las infecciones, la incidencia de infecciones sistémicas por *Candida* se ha incrementado. Por ejemplo, en pacientes con leucemia, el rango de infecciones por *Candida* observadas a la autopsia se incremento en un 35 % en un lapso de 4 años (Fung et al., 1986).

Trabajos recientes muestran que entre las infecciones oportunistas encontradas en pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) las más frecuentes son las causadas por *Candida* y una vasta proporción, 90-95%, desarrollan lesiones clinicas a la par de la enfermedad viral. El Cuadro 7 resume las formas clinicas de las Candidiasis en individuos con HIV positivo.(Ellis, 1994).

Cuadro 7.

FORMAS CLINICAS DE CANDIDOSIS EN PACIENTES CON HIV POSITIVO

- Portador oral asintomático.
- Algodoncillo oral.
- Perlèche (quelitis angular)
- Leucoplasia.
- Laringitis.
- Esofagitis.
- Vulvovaginitis, Balanitis.
- (Diseminación hematógica).

Ellis, 1994.

Traumas, terapia antimicrobiana de amplio espectro o múltiple, terapia con esteroides, dietas ricas en carbohidratos, y cateterización urinaria e intravenosa son factores que predisponen individualmente a la candidosis (Odds,1979).

2.6. DIAGNOSTICO

Llevar acabo el diagnóstico de infecciones de localización profunda causadas por *Candida* es difícil, teniéndose en cuenta que tan sólo un 15 a 40 % de pacientes con evidencia postmortem de Candidiasis diseminada fueron tratados premortem contra ésta enfermedad (DeRepentigny and Reiss, 1984). El diagnóstico de laboratorio para la candidosis ha incluido el cultivo, la detección de anticuerpos y la detección de antígenos. En la actualidad, el diagnóstico de la Candidosis diseminada es primariamente clínico, los métodos empleados en el laboratorio para la identificación del hongo se basan principalmente en la prueba de tubo germinal, la producción de clamidosporas y la

habilidad de asimilar o fermentar carbohidratos (auxonograma y zimograma). La identificación total del hongo por los dos últimos métodos toma de dos a tres días por lo que la prueba de tubo germinal que se realiza en dos horas es muy popular. Sin embargo, las cepas de *C. albicans* no formadoras de tubo germinal representan del 1 al 2 % del total y en ocasiones, algunas formas parecidas al micelio pueden ser confundidas con el tubo germinal en otras especies diferentes a *C. albicans* (Dealler, 1991).

Los aislamientos de *C. albicans* a partir de especímenes clínicos deben ser interpretados con precaución, ya que en pacientes hospitalizados se reconoce la existencia de una mayor proporción de colonización que la encontrada en individuos sanos. Por ejemplo, la prevalencia de *C. albicans* oral y fecal es aproximadamente 10% para adultos normales, mientras que para pacientes hospitalizados es 20% o más (Odds, 1979).

La frecuencia de aislamientos de *C. albicans* es de un 15 % en el caso de muestras vaginales en mujeres sanas y un 10% en muestras urinarias, e infrecuentemente aislada de muestras de piel de individuos normales, así como en proporción variable se recupera del esputo. Por otra parte, se ha demostrado que cultivos positivos de la levadura solo aparecen en un 44 % de pacientes con Candidosis probada a la autopsia y que en contraste, la candidemia no siempre conduce a una enfermedad sistémica. (Myerowitz, et al., 1977).

Los hemocultivos algunas veces no son buenos predictores de una infección sistémica por *C. albicans*. Sin embargo, múltiples cultivos positivos se han correlacionado con infecciones sistémicas causadas por *C. tropicalis* (Sanford, et al., 1980).

La confirmación definitiva se logra por medio de la demostración histopatológica de *Candida* en diferentes órganos.

Los métodos serodiagnósticos para detectar anticuerpos contra *Candida* spp., han incluido aglutinación, contraelectroforesis, doble difusión, inmunoelectroforesis, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo, la prueba de ELISA (DeRepentigny and Reiss,

1984; Odds, 1979). La sensibilidad de estas pruebas diagnósticas en la candidosis sistémicas es de un 50 a 92 % para pacientes inmunocompetentes, con un rango menor de detección en pacientes inmunosuprimidos. Estas pruebas carecen, sin embargo, de especificidad en distinguir entre colonización e invasión localizada profunda (DeRepentigny and Reiss, 1984).

En el diagnóstico de la infección sistémica por *C. albicans*, los métodos empleados se basan en la detección de al menos dos clases de antígenos solubles, uno lábil al calor (proteína o glucoproteína) y otro estable (manana).

En general, las pruebas diagnósticas basadas en la detección de mananas presenta mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de infección sistémica por *C. albicans*, que las pruebas basadas en la detección de antígenos proteicos (Bougnoux, et al., 1990; Lemieux et al., 1990; Phillips, et al., 1990; Repentigny, et al., 1985).

Los métodos que detectan niveles de mananas circulantes incluyen inmunoensayos enzimáticos con anticuerpos policlonales y monoclonales, radioinmunoensayos, coagulación y aglutinación con partículas de látex. Sin embargo, apesar de su valor clínico potencial pocos de estos métodos han sido aceptados para uso diagnóstico cotidiano debido principalmente a que las pruebas más prometedoras requieren de procedimientos complicados y equipos sofisticados para el análisis rápido de una sola muestra lo cual no es práctico, fácil de implementar y costeable en un laboratorio de diagnóstico ordinario; razón por la que numerosos investigadores estan enfocando su atención en las pruebas de aglutinación con partículas de látex (Bailey, et al., 1985; Khan and Jones, 1986; Lemieux, et al., 1990; Thomas, 1986).

3. ANTECEDENTES

3.1. *Cryptococcus neoformans*

La historia de la criptococosis y su hongo causal *Cryptococcus neoformans* data de 1894 cuando Sanfelice recupero del jugo de durazno una levadura encapsulada, que le llamo *Saccharomyces neoformans*. la cual a fines de la decada de 1890 fue aparentemente aislada de lesiones en bovinos, caballo y hombre, estudiandose su patogenicidad, en animales de experimentación y en 1894, el patólogo Busse, a quien junto con Buschke se les acredita el primer reconocimiento de criptococosis en el hombre, se refirió a la enfermedad como *Sacaramicosis hominis* (Rippon, 1982)

En 1901, Vuillemin encontró a la misma levadura en una lesión pulmonar en el cerdo, observando la falta de formación de ascospora que la diferenciaba de los miembros del género *Saccharomyces* y la transfirió al género *Cryptococcus* como *C. hominis*. En 1905 aparentemente Von Hansemann fue el primero en observar al hongo en un caso de meningitis, aunque no fue reconocido antemortem en esta nueva forma clínica hasta que Verse reportó un caso en 1914. (Smith, 1989)

Stoddard y Cutler en 1915, mal interpretaron a la cápsula mucoide del hongo como evidencia de histólisis del huésped y lo nombraron *Torula histolytica*, nombre que recibió mucho apoyo pero que carece de prioridad y no está apoyado por ninguna regla taxónomica, además de que el concepto de actividad litica del hongo es erróneo. Más tarde se produjo una confusión de esta enfermedad por el uso del nombre "blastomicosis" con la blastomicosis Americana, confusión resuelta por Benham, quien en 1935 diferenció claramente éstas y otras micosis causadas por hongos que geman. Aunque ella apoyó la idea de retener el nombre *C. hominis* para el hongo, sin embargo, el nombre más valido basado en el uso y prioridad del hongo es *Cryptococcus neoformans* (Rippon, 1988; Smith, 1989).

Las sugerencias de Shadomy a principios de los 70s de que *C. neoformans* puede ser el estado imperfecto de un Basidiomiceto fue confirmado por Kwon-Chung en 1975, cuando ella demostró la formación de basidiosporas de varios aislamientos (Kwon-Chung,1976). Por otra parte se encontró la existencia de variaciones seróticas entre los aislamientos y *C. neoformans* fue considerado como una especie relativamente homogénea. Sin embargo, investigaciones posteriores revelaron la evidencia de una heterogenicidad dentro de la especie, la cual subsecuentemente se dividió en dos: *C. neoformans* y "*C. bacillispora*"; esta última erigida para reacomodar los serotipos B y C, los serotipos A y D permanecieron en *C. neoformans*.(Kwon-Chung,1976; Kwon-Chung and Bennett, 1988). Estudios más extensos realizados por McGinnis cuestionaron la validez de reconocer "*C.bacillispora*" distinto de *C. neoformans* y en la actualidad se acepta que los cuatro serotipos son variedades de una especie. Así, los serotipos A y D se incluyen como *C. neoformans* variedad *neoformans* y los B y C como *C. neoformans* variedad *gatlif*, el nombre de esta última surge cuando Vanbreuseghem y Takashio en 1970 observaron aislamientos en que se formaban células elongadas así como redondas en cerebro de ratón. Las dos variedades muestran solamente 55-83 % de homología en estudios de hibridación cruzada de DNA pero se han encontrado similares empleando taxonomía numérica.(Staib, 1987; Kwon-Chung et al., 1992).

Para los cuatro serotipos existe variación geografica en la distribución, teniendose que mientras el serotipo A esta extendido en todo el mundo, el D es raro en Estados Unidos pero comun en Europa. Los serotipos B y C parecen restringidos a ciertas zonas tropicales y subtropicales aunque pueden localizarse en zonas geograficas más amplias como en Europa y en el sur de Australia (Ellis,1987). El reservorio natural de los serotipos tambien parece distinto: A y D se asocian comunmente con heces de paloma, mientras el nicho ecológico de B y C se menciona que es el *Eucalyptus cameldulensis* (Ellis and Pfeiffer, 1990) e investigaciones recientes indican que el habitat natural de *C. neoformans* variedad

gattii esta en la variedad de arboles *Eucalyptus* y se localiza tanto en su madera, hojas, flores y frutos (Pfeiffer and Ellis, 1991).

3.2. GENERALIDADES

Cryptococcus neoformans es una levadura capsulada no dimórfica, su habitat principal como ya se menciona es el excremento de paloma en el caso de la variedad *neoformans* y arboles del género *Eucalyptus* en la variedad *gattii*. Existen otras especies no patógenas dentro del género *Cryptococcus*, que pueden diferenciarse de la especie *neoformans*, porque ésta especie se desarrolla de 28 a 37 C y es patógena para el ratón.

Características como presencia de cápsula, forma de célula, aspecto de la colonia, producción de ureasa, asimilación de nitratos, fermentación y asimilación de carbohidratos, nos sirven para diferenciar el género *Cryptococcus* de otras levaduras patógenas (Campbell and Stewarth, 1980).

A diferencia de otras levaduras que producen micosis profundas *C. neoformans* presenta la misma morfología (levaduras cápsuladas) tanto al estado parasitario como vegetativo, es decir no es dimórfico. La formación de una cápsula grande es una característica de *C. neoformans*, cuando se desarrolla en los tejidos y bajo condiciones adecuadas de cultivo, debe señalarse que diversas especies del género *Cryptococcus* (apatógenas), también producen cápsula (Campbell and Stewarth, 1980).

La envoltura celular de *C. neoformans* esta compuesta de lo siguiente: una pared celular rígida constituida principalmente de glucanas; un polisacárido capsular, glucuronoxilomanana (GXM), compuesta de manosa (Man), xilosa (Xil), Ácido glucurónico, y O-acetil; y un mínimo de dos antígenos menores carbohidratos, galactoxilomanana (GalXM) y la manoproteína (MP)(Murphy et al., 1988)

GXM es un polisacárido viscoso, que constituye aproximadamente el 88% de la masa capsular de *C. neoformans*, esta compuesto de enlaces (1-3) α -D-manana sustituidos por

enlaces sencillos (1-2)-D-xilosa y (1-2)-D- Ácido glucosilurónico. La proporción de los componentes del GXM en el serotipo A son xilosa:manosa: Ácido glucurónico (2:5:1) (Cherniak, et al., 1982).GXM es el principal factor de virulencia debido a sus características toleranogénicas y antifagocíticas, las mutantes acapsulares son menos virulentas.(James and Cherniak, 1992).

GalXM y MP estan en una cantidad del 12% de la masa capsular; GalXM ha sido caracterizado y esta constituido por glucosa: manosa: xilosa: Ác. glucurónico en la siguiente proporción 1.9: 1.8 : 1 : 0.2 y un 2% de O-acetilos. (Cherniak et al.,1980; Cherniak et al., 1982).

GXM, GalXM y MP son aislados a partir de medios de cultivo crecidos con la levadura por una precipitación selectiva con etanol y un tratamiento con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). GalXM y MP pueden ser fraccionados por cromatografía de afinidad con concanavalina A (ConA), debido a la afinidad de los residuos de manopiranosil de la MP con la ConA.(Cherniak, et al.,1982).

La MP modula una reacción de hipersensibilidad retardada, mientras que GalXM despierta un pequeña respuesta inmune. El papel de GalXM como un factor de Virulencia no ha sido bien estudiado. Reconociendose a GXM como el mayor factor de la patogenicidad (James and Cherniak,1992).

3.3. PATOGENESIS de *Cryptococcus neoformans*

En el periodo de 1900-1955, Littman y Zimmermann encontraron solo 300 casos de Criptococosis registrados en la literatura médica mundial. En comparación, durante el periodo de 1965 a 1977, Kaufman y Blumer en 1977 documentaron 1264 casos probados de criptococosis solo en Estados Unidos de America, sus datos sugieren que aproximadamente el 20% de los pacientes de quienes se sospecha tienen criptococosis y cuyas muestras se enviaron para pruebas inmunológicas, realmente sufren la enfermedad

(Smith, 1989). Cabe señalar que la diferencia existente entre un periodo y otro es resultado de la mejora en los sistemas diagnósticos, los cuales tienen cada día mayor sensibilidad y especificidad, lo cual aunado al brote de nuevas enfermedades y al empleo de diversos fármacos que al provocar deficiencias en el sistema inmune, facilitan el desarrollo de *C. neoformans*.

Sin duda alguna, la criptococosis es hoy en día una de las micosis sistémicas más prevalentes y mundialmente se le está reconociendo mucho más frecuentemente como una enfermedad de individuos debilitados e inmunológicamente comprometidos. Cuando la enfermedad se presenta en individuos aparentemente normales, es probable que haya defectos sutiles en las defensas del huésped que predisponen a la infección (Rippon, 1982). Aunque la ingestión o implantación cutánea de *C. neoformans* puede conducir al desarrollo de enfermedad sistémica diseminada, parecería que la mayoría de las infecciones se inician vía el tracto respiratorio. El hongo parece residir por al menos 9 años bajo condiciones apropiadas, en excretas secas de paloma en un estado relativamente no encapsulado en partículas de alrededor de 1 a 11 μm de diámetro, pudiendo estar involucradas también las heces de otros pájaros y de especies no aviarias. En condiciones experimentales se ha demostrado que un 15% de partículas de *C. neoformans* viables, que aerosolan del suelo inoculado artificialmente tienen un diámetro de 0.65 a 2 μm , siendo así lo suficientemente pequeñas para depositarse profundamente en el pulmón, ya que es necesario para que el microorganismo penetre al organismo por los pulmones, que la partícula infecciosa sea compatible con la disposición pulmonar. Es clínicamente importante, el que un aerosol este compuesto por partículas menores de 10 μm de diámetro para lograr su llegada hasta el tejido pulmonar. Partículas menores de 5 μm son más compatibles con el tracto respiratorio bajo (Hatch, 1961). Farhi en 1970 demostró que el tamaño de las células de *C. neoformans* decrece en tamaño a 3 μm de diámetro cuando se incubaba en suelo por periodos mayores de un año y Powell, et al. (1972)

reportan que las partículas de *C. neoformans* aisladas de excretas de paloma aerosolizadas son compatibles con la disposición alveolar del pulmón. Las partículas se hacen más pequeñas y las células tienden a tener cápsulas menores de tamaño mientras más tiempo permanecen en el suelo, presumiblemente debido al secado. Bajo condiciones más naturales, 7.5% de los criptococos aerosolados apartir de heces de paloma secas tienen un diámetro de 1.1 a 3.3 μm ; encontrándose además torres infectadas por palomas que contienen alrededor de 300 partículas viables de *C. neoformans* por 100 m^3 de aire. Las células menores a 2 μm son lo suficientemente pequeñas para diseminarse por corrientes de aire y se depositan en los alvéolos pulmonares donde rápidamente sintetizan material capsular, teniéndose que la temperatura, la hidratación y la concentración de CO_2 en los tejidos animales parece influir en la producción y tamaño de la cápsula. Aún con todo lo anterior solo se han intentado investigaciones limitadas, pero en aumento acerca de la estructura y actividad antigénica del polisacárido capsular (Cherniak et al., 1980; Cherniak, et al 1982). Más recientemente, se ha reportado el aislamiento de células de *C. neoformans* menores de 1.1 μm de diámetro, las pequeñas levaduras fueron capaces de causar la enfermedad en ratones al ser inoculadas intracranalmente.

Aparentemente, *C. neoformans* puede utilizar materia fecal aviar donde el contenido de creatinina es importante para crecer registrándose niveles de criptococos tan altos como 5×10^7 células/g de materia fecal (Rippon, 1982).

Con base en lo anterior, hay controversia acerca de si *C. neoformans* es capaz de crecer y ser comensal en el tracto alimentario de la paloma pues ciertamente puede encontrarse "endosaprofiticamente" en los granos y puede sobrevivir la transferencia pasiva a través de tracto gastrointestinal y depositarse en las heces donde puede sobrevivir incluso por años. El tracto gastrointestinal de otros animales (ej. ratones) puede tener un papel similar. Aunque se ha observado que el crecimiento continuo de bacterias o la presencia de

condiciones alcalinas puede inhibir la sobrevivencia de *C. neoformans* en heces (Swinne-Desgain, 1975).

De otros estudios se sabe que la fase sexual de *Cryptococcus neoformans*, la *Filobasidiella neoformans* produce basidiosporas de un diámetro 1.8-2.5 μm , sugiriéndose ésta como el posible medio de infección. (Fung and Murphy, 1982). Después de la inhalación, se inicia un foco pulmonar primario que involucra probablemente a los nódulos linfáticos; el destino de la levadura depende de la resistencia y competencia inmunológica del huésped. A este respecto, es significativa la naturaleza de una respuesta inflamatoria transitoria aguda que sucede durante las primeras horas en que el criptococo esta en el pulmón. Así, no es sorprendente que los agentes antiinflamatorios incrementen la posibilidad de enfermedad criptococcica y su diseminación y pueden potenciar/reactivar lesiones latentes pulmonares o de Sistema Nervioso Central (SNC) (Diamond, 1977).

Una variedad de mecanismos bioquímicos de la patogenesis han sido examinados. Aunque la producción de ureasa por *C. neoformans* no ha sido claramente implicada en la patogenicidad de la levadura, aún cuando se ha sugerido que la ureasa induce la liberación de amoniaco, el cual puede destruir la función del complemento del hospedero y con ésto reducir sus defensas y facilitar el crecimiento fungal. Se sabe además que *Cryptococcus neoformans* no puede emplear las proteínas séricas del humano, así como que la levadura libera proteasas que activamente degradan el fibrinógeno humano *in vitro*, lo cual sugiere que si la actividad de las proteasas ocurre *in vivo*, es posible explicar la carencia de fibrosis e hialización alrededor de las lesiones criptococales. (Smith and Rommel, 1977).

El papel del polisacárido capsular de *C. neoformans* ha sido directamente involucrado en la patogenesis de la levadura, reportándose que un 24% de leucocitos humanos fagocitan cepas capsuladas de *C. neoformans*, mientras que la proporción de cepas no capsuladas que son fagocitadas va de un 75 a 84%; lo que determina que se le considere al polisacárido capsular como un específico y potente inhibidor de la fagocitosis (Bulmer and

Sans, 1967 y 1968). También se ha observado que los leucocitos polimorfonucleares periféricos rodean y matan a las células de *C. neoformans*, sin embargo, el proceso puede ser inhibido por pequeñas cantidades de material capsular. Otras investigaciones han reportado que los macrófagos periféricos no son capaces de matar a *C. neoformans* y también se reconoce que macrófagos alveolares tanto de cobayos como de humanos fagocitan pero no destruyen las cepas no capsuladas de *C. neoformans* (Diamond and Bennett, 1973).

La personas estan frecuentemente expuestas a *C. neoformans* por la inhalación de células desecadas localizadas en el medio ambiente. La exposición natural raramente resulta en síntomas clínicos asociados con criptococosis, debido a que los mecanismos inatos de resistencia celular están presentes en el pulmón y son efectivos para controlar al invasor. En pocos casos donde el microorganismo causa infección, ésta permanece localizada (James and Cherniak, 1992). En pacientes donde el sistema inmune está debilitado por quimioterapia o enfermedad, es más factible que la exposición a *C. neoformans* desarrolle en enfermedad. Teniendo la levadura una predilección por el sistema nervioso central, donde causa la meningoencefalitis criptococica (James and Cherniak, 1992), por otra parte la criptococosis ha emergido como una de las enfermedades más oportunistas en pacientes diagnosticados con SIDA teniendo más del 10% de pacientes diagnosticados con SIDA que también sufren criptococosis. Si la progresión de la enfermedad no es controlada, la diseminación a otros tejidos resulta en un factor amenazante para la vida, siendo así la Criptococosis la cuarta infección más importante en pacientes con SIDA después de *Pneumocystis carinii*, citomegalovirus, y *Mycobacterium avium-intercellulare* (Dismukes, 1988).

Como ya se menciona *C. neoformans* es de las causas más frecuentes de enfermedad fúngica invasiva en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). La incidencia es variable y va de un 2 al 9% en pacientes en los Estados Unidos de América

hasta más del 30% en Africanos (Denning et al.,1990) siendo la más devastante y comun forma de la enfermedad la meningitis. La criptococosis pulmonar ha sido reportada en un número pequeño de individuos con SIDA, desconcertante hecho si se sabe que los pulmones son probablemente la mayor ruta de entrada de este microorganismo (Rippon,1988). De 3,170 pacientes con SIDA reportados entre 1983 a 1984 en los EUA, 189 (6%) desarrollaron criptococosis y en 167 casos la localización fue meníngea (Staib, 1987). Los pacientes con SIDA están severamente restringidos en su habilidad de despertar una respuesta inmune mediada por células, lo cual los hace particularmente vulnerables a la criptococosis, ya que la inmunidad mediada por células es el mecanismo primario que elimina a la levadura del pulmón (respuesta inmune mediada por células contra el antígeno soluble que ha sido bien estudiado).

3.4.INFECCIONES CAUSADAS POR *C. neoformans* EN HUMANOS

En humanos el *C. neoformans* es el agente causal de la Criptococosis, también llamada Blastomycosis Europea, enfermedad de Busse-Buschke o Torulopsis (Bonifaz,1990).

La Criptococosis se inicia como una enfermedad pulmonar con diseminación hematógena a la piel, huesos, visceras y especialmente al SNC, lo que indica la naturaleza transitoria de la lesión pulmonar, la cual se encapsula y se transforma en "criptococoma", a veces sana sin dejar cicatrices residuales. La criptococosis pulmonar puede ser sintomática o asintomática. Las personas que sufren mermas en su estado fisico, padecimientos como Linfoma Maligno, Lupus Eritematoso Sistémico, Tuberculosis o bien que han recibido terapia con corticosteroides, antibióticos, son altamente susceptibles a sufrir esta enfermedad.

Los criptococos se han recuperado de esputo en ausencia de enfermedad, pero es más comun en pacientes con congestión en las vías aéreas. El espectro clínico de la criptococosis ha sido clasificado en cinco tipos: (1) pulmonar, (2) sistema nervioso central,

(3) dérmico o cutáneo, (4) óseo y (5) visceral (Emmons and Utz,1970; Bonifaz, 1990). La Criptococosis pulmonar puede ser benigna o crónica; la Criptococosis cerebral, se puede presentar en forma meningítica, meningoencefálica o criptococoma (granuloma cerebral). En el caso de pacientes con HIV infectados por *C. neoformans*, la infección comienza con un foco primario en el pulmón con pocos síntomas, significando que las colonias pueden localizarse en múltiples regiones del cuerpo y órganos, dando así el primer signo de manifestación extrapulmonar y extracerebral que dificulta el diagnóstico. Además se ven involucrados el pulmón y el SNC, observándose manifestaciones en enfermos con SIDA en corazón, nódulos linfoides, bazo, hígado, médula ósea, articulaciones, riñones, próstata, tiroides, adrenales, ojos, intestino y piel (Staib, 1986). Aunque el microorganismo también puede ser aislado de sangre (Eng et al.,1986). En la invasión del SNC, las meninges y las cavidades cerebrospinales están involucradas, lo cual explica la presencia de *C. neoformans* y su antígeno en el fluido cerebroespinal (Staib, 1987), así también se ha localizado en fluido seminal en pacientes con SIDA (Staib et al., 1989).

3.5. DIAGNOSTICO

La criptococosis es diferenciada de otras infecciones pulmonares por demostración de la levadura mediante tinciones (Mucicarmina ó tinción negativa) y su cultivo. El examen microscópico directo, se debe realizar sin fijar la muestra con calor, ya que la levadura se colapsa y tiñe erróneamente por lo que puede pasar irreconocible, por lo que se recomienda el uso de tinta china para poner de manifiesto la cápsula.

Para su cultivo se han desarrollado medios específicos que permiten el aislamiento primario de *C. neoformans* como es el medio de Níger (*Guizotia abyssinica*) desarrollado por Staib.(Ellis, 1994)

Para la completa identificación en el laboratorio de *C. neoformans* se debe aislar la levadura, observar su desarrollo en SDA a 37 C y en medio Níger, su capacidad para

producir cápsula, prueba de asimilación de nitratos y carbohidratos, fermentación de carbohidratos y prueba de patogenicidad en ratón; la incapacidad del microorganismo de producir micelio es una prueba confirmativa (Rendón, 1986).

Los estudios de laboratorio de criptococosis no deberían limitarse a la búsqueda microscópica y en cultivo del agente causal sino que debería incluir simultáneamente pruebas para detectar la presencia de antígeno en el suero y en el fluido cerebrospinal (si fuera apropiada, también en otros fluidos corporales como son fluido pleural u orina).

La rápida formación de grandes cantidades de antígeno de *C. neoformans* en pacientes con SIDA, hace que la prueba de antígeno usando suero y líquido cerebrospinal sea el método serológico de elección. El título de antígeno puede proporcionar una indicación de la etapa y extensión de la infección, mientras su dinámica puede usarse para evaluar el efecto terapéutico, recaída y pronóstico. La técnica descrita por Bloomfield et al., en 1963 para la detección del antígeno de *C. neoformans* en fluidos corporales, la prueba de aglutinación en látex, se ha vuelto el método serológico confiable en el diagnóstico de criptococosis y se ha perfeccionado la técnica y elementos inespecíficos como el factor reumatoide, por ejemplo, que puede conducir a resultados falsos positivos han sido grandemente eliminados por un tratamiento proteolítico previo (Stockman and Rogers, 1982; Bennett and Bailey, 1971; Scott et al., 1980).

4. JUSTIFICACION

El diagnóstico certero de las micosis resulta de vital importancia para el tratamiento clínico específico. Para una correcta evaluación de los casos se debe contar con un método diagnóstico que cumpla las características de tener alta sensibilidad y especificidad, lo que resulte en una identificación precisa del agente etiológico implicado. En el desarrollo de pruebas inmunológicas específicas y sensibles se debe contar, en la manera de lo posible, con antígenos del microorganismo involucrado los cuales sean característicos y aparezcan de manera constante durante la infección en el huésped. Es por ello, que la purificación de antígenos de *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* involucrados en la respuesta inmune, son un elemento imprescindible para el establecimiento de técnicas diagnósticas que faciliten una rápida y precisa identificación, si se tiene en cuenta que ambas son enfermedades cuya presentación sistémica en individuos comprometidos va tomando cada día mas relevancia.

5. OBJETIVOS GENERALES:

A) Obtener fracciones antigénicas de los hongos *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*, para desarrollar técnicas diagnósticas.

B) Producir anticuerpos en animales de laboratorio (conejos), con el fin de obtener sueros hiperinmunes para la prueba de detección de antígeno.

C) Estandarizar técnicas diagnósticas empleando los antígenos obtenidos y los sueros hiperinmunes para la detección de antígeno circulante en ambas enfermedades.

5.1. Objetivos particulares:

- 1. Extraer y purificar el antígeno crudo capsular de *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* y *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*.**
- 2. Extraer y purificar el antígeno de pared (Mananas) de *Candida albicans***
- 3. Producción de Sueros hiperinmunes en conejos de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* y *Candida albicans*.**
- 4. Estandarización de la técnica de aglutinación en látex para el diagnóstico de antígeno circulante en el caso de infecciones causadas por *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*.**
- 5. Determinación espectrofotométrica de la aglutinación con partículas de látex para *Candida albicans*.**

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. PRODUCCION DE BIOMASA.

Se utilizaron cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* donadas por el laboratorio de Micología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. Se realizó la prueba de API-20C (Merck) para confirmar los géneros y las especies de las cepas utilizadas. Las pruebas de D-Prolina, inhibición de la enzima ureasa por EDTA y crecimiento en el medio CGA (canavanina-glicina-azul de bromotimol) se emplearon para la identificación de las variedades *neoformans* y *gattii* de *Cryptococcus neoformans*. (Kwon-Chung et al., 1982)

a) *Candida albicans*.

A partir de un tubo con Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) sembrado con *Candida albicans* con 24 horas de crecimiento se preparó un inóculo resuspendiendo las levaduras en 5 ml de solución salina fisiológica (SSF). Se preparó a partir de esta una suspensión de *C. albicans* de 2.4×10^8 y se inóculó en 100 ml de Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) (Bioxon), dejándose crecer por 24 horas a temperatura ambiente en agitación constante en un agitador orbital a 150 rpm/min, posteriormente se inocularon dos matraces de 2000 ml con 1000 ml de CDS con la biomasa obtenida, estos segundos inóculos se dejaron crecer por 72 horas a temperatura ambiente y en agitación constante, pasado este tiempo se inóculó un botellón de policarbonato que contenía 12 litros de CDS, se mantuvo a 37 C durante 72 horas con bombeo continuo de aire estéril para favorecer el desarrollo. Al final del periodo de crecimiento, se concentraron las células mediante un cartucho Durapore, de Millipore. Después se centrifugó la biomasa concentrada a 3500 rpm por 30 minutos y se lavaron 2 veces con SSF.

b) *Cryptococcus neoformans*.

Para cultivar las dos variedades se utilizó el caldo GGA-B (Caldo glutamina-glicina-asparagina) (Chaskes and Tyndal,1975), el cual se selecciono por permitir que *C. neoformans* desarrolle un mejor tamaño de cápsula.

Las levaduras fueron transferidas del medio 2% de extracto de levadura,2% de glucosa y 2% de agar (GYE) a tubos inclinados de Agar morfológico para levaduras más 1% de agar (YMA) e incubados a 37 C por dos días.

Las levaduras fueron suspendidas en 5 ml de Solución Salina fisiológica estéril y contadas en el hemocitometro, 2×10^8 UFC se agregaron a un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 200 ml de GGA-B (Caldo sintético de glutamina,glicina y asparagina). El matraz se incubó toda la noche a 37 C en agitación orbital a 1500 rpm.(Muchmore et al.,1980).

Este cultivo proporcionó el inoculo para 4 matraces, los cuales se incubaron por 4 días, tiempo en el cual producen la fase estacionaria.

La morfología, tamaño de cápsula, y uniformidad de las células se evaluaron por microscopia. La pureza microbiológica de cada matraz se confirmó por siembra por estría de muestras en cajas de SDA. Estas cajas se incubaron a 37 C y se observaron 5 días. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 10,000 x g por 30' a 4 C.

6.2. OBTENCION DE ANTIGENOS.

a) EXTRACCION DE MANANAS DE *C. albicans*.

Se siguió la técnica descrita por Valdespino (1988). La biomasa concentrada obtenida se hidrolizó con NaOH al 6% de concentración final a 80 C durante 3 horas. El hidrolizado se centrifugó a 6,000- 7,000 rpm durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se ajustó a pH 5.0 con ácido acético glacial. Se centrifugó nuevamente a 6,000-7,000 rpm por 15 minutos. Al sobrenadante se le agregó solución de Fehling (vol/vol), se centrifugó otra vez. La pastilla obtenida se resuspendio con HCl 3N y se precipitó con metanol frio. El

precipitado obtenido se lavó con acetona 3 veces. Se evaporó la acetona y se resuspendieron las mananas en agua destilada. Las mananas así obtenidas no son solubles. Debido a la necesidad de solubilizar las mananas para su uso posterior, se siguió la técnica modificada por Pike (Dorskeland and Berdal, 1980; Pike, et al., 1991). En ésta un ml de muestra se mezcla con 0.4 ml de Buffer Salino de Glicina 0.1 M (pH 7.4) conteniendo E.D.T.A. 0.1 M, la mezcla se hierve 5 minutos. Posteriormente se centrifuga a 3500 rpm por 20 minutos y se conserva el sobrenadante a -20 C hasta que se realice la cuantificación de mananas.

b) EXTRACCION DEL POLISACARIDO CRUDO DE *C.neoformans*.

La biomasa obtenida de ambas variedades (*neoformans* y *gattii*) se centrifugó a 10 000 x g por 30 minutos a 4 C (previamente inactivadas con calor a 60 C durante 60 min). El sobrenadante se pasó através de membranas Millipore de 0.45 μ m, éste ya clarificado se le extrajo el agua hasta hacerlo viscoso utilizando polivinil pirrolidona ó azúcar glass.

El filtrado concentrado se dializó toda la noche a 4 C contra 10 volúmenes de agua destilada, después de la diálisis se adiciono al sobrenadante acetato de sodio al 10% y Ácido acético glacial al 1% (vol/vol). El precipitado de polisacárido crudo se removió por centrifugación y se redisolvió en agua destilada, se dializó por 2 días contra varios cambios de agua destilada para remover el acetato como paso final. (Small et al., 1986)

6.3. DETERMINACION DE LA PUREZA DE LOS ANTIGENOS.

Se valoró la cantidad de las mananas y del polisacárido crudo mediante la técnica de Bradford (1976) para proteínas y la de Dubois *et al.*(1956) para carbohidratos. Para la calidad de las mananas y del polisacárido crudo se realizó al análisis de espectro de infrarrojo en pastilla de bromuro de potasio comparando los antígenos obtenidos con estandares de Mananas (Sigma M-3640) y Polisacárido crudo de *Cryptococcus neoformans* (Wampole Laboratories 39D2). El uso del espectro de infrarrojo es uno de los análisis

realizados en una sustancia que mayor información puede dar de la naturaleza de la misma, es por eso que en algunas ocasiones se llega a nombrar la región del espectro de infrarrojo como región dactiloscópica. Y es que dos sustancias que presentan espectros de infrarrojo similares son de hecho idénticas en miles de propiedades físicas, por lo que ciertamente deben tratarse del mismo compuesto (Morrison and Boyd, 1987).

6.4. PRODUCCION DE SUEROS HIPERINMUNES.

a.) *Candida albicans*.

Se utilizaron conejos hembra raza Nueva Zelanda de 2.5 Kg de peso aproximado con el siguiente protocolo de inoculación (Bailey et al.,1985): se inoculó 1 ml de células completas de *Candida albicans* inactivadas por calor a una concentración de 2×10^8 células/ml cinco veces por semana hasta que se tuvo un título de aglutinación en placa de 1:1,024. La prueba de aglutinación en placa se realizó a temperatura ambiente con rotación de 160 rpm por 10 minutos. En una placa de aglutinación se colocaron 50 microlitros de suero y 50 microlitros de suspensión de células de *Candida albicans* al 2%, se mezclaron y se agitaron hasta leer el resultado; como control negativo se utilizó suero normal de conejo y como control positivo suero hiperinmune contra *Candida albicans* donado por el laboratorio de Micología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la FES-Cuautitlán, UNAM.

También se comprobaron los niveles de anticuerpos por medio de una prueba de doble difusión, utilizando como antígenos un sonicado de *Candida albicans* y las mananas obtenidas previamente (Valdespino, 1988 ; Segundo, 1991).

Al obtenerse los títulos requeridos se sangró en blanco a los conejos por la vena marginal de la oreja con la ayuda de una bomba de vacío y por punción cardíaca (Krivoshein, 1989).

b) *Cryptococcus neoformans*.

Se utilizaron conejos raza Nueva Zelanda de un peso aproximado de 2.5 Kg, el protocolo de inoculación fue el siguiente: por vía intravenosa se inoculó 1 ml de una suspensión a 2.4×10^8 células/ml diariamente durante trece días, y se repitió, después de dos a tres semanas la misma serie, estimulando altos títulos. (Muchmore et al., 1980) Los títulos fueron determinados por aglutinación en placa, empleando células completas de *Cryptococcus neoformans* al 2 % (paquete celular- volumen).

6.5. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN GLOBULÍNICA DEL SUERO.

Para obtener la fracción de gammaglobulinas del suero hiperinmune contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* se siguió el método de precipitación con sulfato de amonio (Hebert et al., 1972).

Con el objeto de comprobar si existe diferencia entre las partículas de látex recubiertas con IgG (fracción globulínica) y partículas de látex recubiertas con antisuero, para lo cual se fraccionó únicamente la mitad del total del antisuero obtenido, con esta fracción se recubrió un lote de partículas de látex y el resto se recubrieron con la mitad del suero hiperinmune completo (Khan and Jones, 1986).

6.6. SENSIBILIZACIÓN DE PARTICULAS DE LÁTEX.

Se emplearán esferas de poliestireno de 0.8 micrometros de diámetro (SIGMA LB-8) para preparar las partículas control y las partículas sensibilizadas. Se ajustó una suspensión de partículas de látex a una D.O. de 0.3 a 650 nm en Buffer Salino de Glicina (NaCl 0.85% y Glicina 0.75%, pH 8.2) y se incubaron a 37 C por una hora con un volumen igual de suero o de solución de inmunoglobulina de conejo a la dilución óptima. La dilución óptima del suero y de la solución de IgG se seleccionaron por titulaciones en cuadrícula con manana y polisacárido crudo como antígeno; por medio de la titulación se determinó que dilución de

siero y de solución de IgG se utilizaría para recubrir las partículas de látex; se eligió la mayor dilución que diera las partículas de látex más sensibles, es decir, aquellas partículas de látex que detectaran adecuadamente la menor cantidad de antígeno posible.

Pasada la hora de incubación, se centrifugaron las partículas de látex a 3500 rpm por 20 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se lavó 2 veces el paquete de partículas de látex con Buffer Salino de Glicina. Finalmente, se resuspendieron las partículas de látex en una quinta parte del volumen original.

Para la preparación de partículas de látex control negativo se siguió el mismo procedimiento, sin embargo, para su recubrimiento se utilizó suero hiperinmune contra *Dermatophilus congolensis* el cual es un microorganismo no relacionado con *Candida albicans*. El suero hiperinmune contra *Dermatophilus congolensis* fue una donación del laboratorio de Micología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M.

6.7. PRUEBA DE AGLUTINACION CON PARTICULAS DE LATEX.

Para la prueba de aglutinación con partículas de látex se prepararon diferentes diluciones de mananas 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 µg/ml; así, como diluciones dobles del polisacárido crudo hasta 1:1024 para determinar la mínima concentración de mananas y polisacárido crudo detectados por este método. En cada corrida se utilizó como control positivo las partículas de látex provistas en un kit comercial (Candida Latex Test, DIFCO; Crypto-LA Test, Wampole Laboratories), y como control negativo, tanto las partículas de látex preparadas en el laboratorio con suero hiperinmune contra *Dermatophilus congolensis* como las partículas de látex control negativo provistas en los kits comerciales.

La prueba de aglutinación se realizó en una placa de vidrio con cuadrícula de 2 x 2 cm, cada lado de la cuadrícula se marco con cera para evitar el escurrimiento del líquido al agitarse.

Se colocaron 30 µl de solución de mananas en cada cuadrícula de la placa. Se agregaron 30 µl de partículas de látex recubiertas con suero antimananas y se mezcló perfectamente con un aplicador de madera. En el caso del polisacárido crudo se colocaron 40 µl del antígeno y 20 µl de las partículas de látex recubiertas con el suero antipolisacárido. Se colocó la placa en cámara húmeda y se agitó por espacio de 10 minutos a 100 rpm aproximadamente. A los 10 minutos, se procedió a la lectura (Khan and Jones, 1986). La forma de evaluar la aglutinación fue la siguiente: -, +, ++, +++, según el grado de aglutinación observado a simple vista (Kabasawa et al.,1991). Este mismo procedimiento se siguió para probar las partículas de látex recubiertas con IgG.

6.8. METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA EVALUAR LA PRUEBA DE AGLUTINACION EN LATEX PARA EL ANTIGENO MANANA DE *Candida albicans*.

Se emplearon partículas de poliestireno de 0.8 µm de diámetro las cuales fueron ajustadas a una densidad óptica de 1.0 a 400 nm en buffer de Glicina 0.1 M y NaCl 0.9% a pH 8.2, se sensibilizaron con un volumen igual de suero hiperinmune contra *Candida albicans* durante 1 hora a 37 C de forma estática. Se lavaron dos veces con el Buffer de Glicina-NaCl 13,000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en un volumen igual al inicial. Se emplearon viales con capacidad de 1.5 ml, los cuales fueron llenados con 1 ml de Buffer Glicina-NaCl conteniendo diferentes concentraciones dobles del antígeno manana (SIGMA M-3640), y se agregó las partículas de látex sensibilizadas de tal forma que quedaran al 1% en cada uno de los viales. Los viales se agitaron de manera orbital durante 2 horas a temperatura ambiente para posteriormente tomar 200 µl de cada vial para leerlo a 405 nm en el espectrofotómetro (Elisómetro). (Lim and Fox, 1987; Lim and Choy, 1988)

6.9. PRUEBAS CRUZADAS:

a) Para *Candida albicans*.

Para asegurarnos de la especificidad de la prueba de aglutinación, se realizó una prueba cruzada con *Cryptococcus neoformans* el cual es un microorganismo de importancia clínica en el humano que pudiera presentar cruce antigénico con *C. albicans* debido a su semejanza estructural. La prueba consistió en mezclar 30 µl de una suspensión de células completas de *Cryptococcus neoformans* al 2 % (vol/vol) a diferentes diluciones dobles con 30 µl de partículas de látex sensibilizadas con suero antimananas, se mezcló perfectamente con un aplicador de madera y se siguieron los pasos descritos para la lectura de la prueba de aglutinación de la solución de mananas.

b) Para *Cryptococcus neoformans*.

Se probó la especificidad de la técnica de aglutinación desarrollada para *C. neoformans* contra *Candida albicans* y además se realizó la aglutinación entre los anticuerpos producidos de ambas variedades de *C. neoformans* contra los antígenos de la variedad *neoformans* y *gattii* para saber si existía especificidad de variedad.

La prueba se realizó mezclando 40 µl de una suspensión de células completas de *C. albicans* al 2% (vol/vol) con 20 µl de partículas sensibilizadas con suero hiperinmune anti-*C. neoformans*, empleándose volúmenes similares para ambas variedades de *C. neoformans*; posteriormente se mezcló con un aplicador y se colocó en cámara húmeda sobre un agitador orbital por 5 minutos a 150 rpm, para posteriormente realizar la lectura. Se ocuparon diluciones dobles de las células completas tanto de *C. neoformans* y *C. albicans*.

7. RESULTADOS

7.1. Concentración de los Antígenos

Las concentraciones de Carbohidratos y Proteínas de las extracciones de manoproteína (manana) de *Candida albicans* y del polisacárido crudo de *Cryptococcus neoformans* en sus variedades *neoformans* y *gattii* se muestran en el Cuadro 8.

En cuanto a las mananas de *Candida albicans* se obtuvo una concentración de carbohidratos de 40.09 $\mu\text{g/ml}$ y de proteínas de 11.24 $\mu\text{g/ml}$. Para *Cryptococcus neoformans* la concentración de polisacárido crudo medido como carbohidratos fue de 6.42 para la variedad *neoformans* y 4.96 $\mu\text{g/ml}$ para la variedad *gattii*.

7.2. Pureza de los Antígenos

Las Figuras 2, 3, 4, 5 y 6 muestran el comportamiento de los antígenos extraídos en comparación con estándares de referencia al ser sometidos al análisis de espectro de infrarrojo, resultaron similares a las muestras obtenidas.

7.3. Titulación de Sueros Hiperinmunes

a) Concentración de proteínas.

De los sueros hiperinmunes obtenidos de conejos la concentración de proteínas fue de 1302.5 $\mu\text{g/ml}$ y 835.12 $\mu\text{g/ml}$ para *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* y *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii* respectivamente, en cuanto a *Candida albicans* la concentración fue de 1048 $\mu\text{g/ml}$. (Cuadro 9).

b) Titulos.

En la determinación de los títulos de los sueros hiperinmunes, para *Candida albicans* en aglutinación en placa se obtuvo un título de 1:1024 y en la prueba de doble inmunodifusión (Ouchterlony) empleando mananas solubles fueron títulos de 1:16 y cuando se utilizó un sonocado de células de *Candida albicans*, se obtuvo un título de 1:8. En el caso de *Cryptococcus neoformans* en la prueba de aglutinación en placa los títulos alcanzados fueron de 1:2048 y 1:1024 para la variedad *neoformans* y *gattii* respectivamente, así como en la prueba de doble inmunodifusión los títulos fueron de 1:8 para ambas variedades. (Cuadro 10 y 11)

7.4. Pruebas de aglutinación en látex.

Para la prueba de aglutinación en látex se sensibilizaron las partículas de látex con una dilución del suero 1:2, dilución seleccionada mediante la titulación en tablero de ajedrez; además, se trabajó con suero y no con IgG (fracción globulínica) debido a los mejores resultados. (Cuadro 12, 13, 14, 15, 16 y 17).

En la prueba de aglutinación en látex (Cuadro 18 y Figura 7) para *Candida albicans* la mínima concentración que pudo detectarse fue de 15 µg/ml con las partículas sensibilizadas con el suero diluido 1:2. En el caso de *Cryptococcus neoformans* (Cuadro 19 y 20; Figura 8 y 9) la mínima concentración detectada fue de 25 ng/ml y 19 ng/ml para la variedad *neoformans* y *gattii* respectivamente, así mismo se muestra el comportamiento que tuvieron los controles. En la determinación espectrofotométrica de la aglutinación en látex para el antígeno Manana, se realizó la prueba por triplicado (Cuadro 21), para realizar la graficación (Figura 10) de los datos. La gráfica nos muestra un punto final de detección a la concentración de 1 µg/ml de Mananas.

7.5. Pruebas Cruzadas

En el Cuadro 22 se muestran los resultados de las pruebas cruzadas tanto para *C. albicans* y *C. neoformans*, donde es claro que no existe reacción cruzada entre el antisuero de *C. albicans* al enfrentarse a células de *C. neoformans*, ni tampoco del antisuero de *C. neoformans* contra células de *C. albicans* lo que ratifica la especificidad de los sueros producidos.

Al enfrentarse el antisuero de *C. neoformans* var. *neoformans* a células de *C. neoformans* var. *gattii* y al reaccionar el antisuero *C. neoformans* var. *gattii* con células de *C. neoformans* var. *neoformans* se encontró reacciones de aglutinación por lo que se puede decir que no existe especificidad de variedad en los sueros producidos para *C. neoformans* y sus dos variedades.

Cuadro 8.
CONCENTRACION DE LOS ANTIGENOS

MANANAS		
<i>C. albicans</i>	CARBOHIDRATOS	40.093 µg/ml
	PROTEINAS	11.243 µg/ml
POLISACARIDO CRUDO		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CARBOHIDRATOS	
	variedad <i>neoformans</i>	6.42 µg/ml
	variedad <i>gattii</i>	4.96 µg/ml

Cuadro 9.
CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LOS ANTISUEROS

ANTISUERO	CONCENTRACION DE PROTEINAS
ANTI-<i>Candida albicans</i>	1048.0 µg/ml
ANTI-<i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>neoformans</i>	1302.55 µg/ml
ANTI-<i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>gattii</i>	835.12 µg/ml

Cuadro 10.
TITULOS DE LOS ANTISUEROS
DE *Candida albicans*

PRUEBA	TITULO
AGLUTINACION EN PLACA :	1 : 1024
INMUNODIFUSION DOBLE :	
SONICADO DE <i>C. albicans</i>	1 : 8
MANANAS SOLUBLES	1 : 16

Cuadro 11.
TITULO DE LOS ANTISUEROS
DE *Cryptococcus neoformans*

PRUEBA	TITULO
AGLUTINACION EN PLACA	
variedad <i>neoformans</i>	1 : 2048
variedad <i>gattii</i>	1 : 1024
INMUNODIFUSION DOBLE	
variedad <i>neoformans</i>	1 : 8
variedad <i>gattii</i>	1 : 8

Cuadro 12.
TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS
CON SUERO ANTI-*Candida albicans*

Dilución de partículas de látex sensibilizadas

MANANAS (μg/ml)	concentrado	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
40	+++	+++	+	+	-	-	-
35	+++	+++	+	+	-	-	-
30	+++	++	-	-	-	-	-
25	+++	++	-	-	-	-	-
20	+++	++	-	-	-	-	-
15	++	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-
0.01	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 13.
TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS
CON IgG ANTI-*Candida albicans*

Dilución de partículas de látex sensibilizadas

MANANAS ($\mu\text{g/ml}$)	<i>concentrado</i>	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
40	++	-	-	-	-	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-
0.01	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 14.
TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS
CON SUERO ANTI- *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans*

Dilución de partículas de látex sensibilizadas									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1:2	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
1:4	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
1:8	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
1:16	++	+	+	-	-	-	-	-	-
1:32	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1:64	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-

E.C.P. = Extracto crudo de polisacárido.

Cuadro 15.

**TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS
CON IgG ANTI- *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans***

Dilución de partículas de látex sensibilizadas

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1:2	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
1:4	++	-	-	-	-	-	-	-	-
1:8	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:128	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-

E.C.P.= Extracto crudo de polisacárido.

Cuadro 16.
TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS
CON SUERO ANTI- *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*

Dilución de partículas de látex sensibilizadas									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1:2	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
1:4	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
1:8	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
1:16	++	+	+	-	-	-	-	-	-
1:32	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1:64	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-

E.C.P.= Extracto crudo de polisacrido.

Cuadro 17.
TITULACION DE LAS PARTICULAS DE LATEX SENSIBILIZADAS
CON IgG ANTI- *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*

Dilución de partículas de látex sensibilizadas									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1:2	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
1:4	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1:8	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:16	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:128	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-

E.C.P. = Extracto crudo de polisacárido.

Cuadro 18.

**CONCENTRACION MÍNIMA DETECTADA MEDIANTE DIFERENTES
SISTEMAS PARA LA
MANANA DE *C. albicans***

NÚMERO	CONCENTRACION DE MANANAS (BU/ml)	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	LATEX/ SUERO	LATEX/ IgG
1	40	+++	-	+++	+
2	35	+++	-	+++	-
3	30	+++	-	+++	-
4	25	+++	-	++	-
5	20	+++	-	++	-
6	15	+++	-	+	-
7	10	+++	-	-	-
8	5	+++	-	-	-
9	4	+++	-	-	-
10	3	+++	-	-	-
11	2	++	-	-	-
12	1	+	-	-	-
13	0.5	+	-	-	-
14	0.1	+	-	-	-
15	0	-	-	-	-

Cuadro 19.
CONCENTRACION MINIMA DETECTADA MEDIANTE DIFERENTES
SISTEMAS PARA EL
ECP DEL *C. neoformans* var. *neoformans*

NUMERO	DILUCION ECP	ECP var. <i>neoformans</i> (ng/ml)	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	LATEX/ SUERO	LATEX/ IgG
1	CONCENTRADO	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	++	-	-	-

ECP= Extracto Crudo de Polisacárido

Cuadro 20.
CONCENTRACION MINIMA DETECTADA MEDIANTE DIFERENTES
SISTEMAS PARA EL
ECP DEL *C. neoformans* var. *gattii*

NUMERO	DILUCION ECP	ECP var. <i>gattii</i> (ng/ml)	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	LATEX/ SUERO	LATEX/ IgG
1	CONCENTRADO	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	++	-	-	-

ECP= Extracto Crudo de Polisacárido

Cuadro 21.
DATOS DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA
EVALUAR LA PRUEBA DE AGLUTINACION EN LATEX DE
Candida albicans

REPETICIONES

MANANAS	1	2	3	\bar{x}	DS
1 mg	0.069	0.079	0.060	0.066	0.009
250 mg	0.066	0.068	0.063	0.066	0.002
187.5 μg	0.058	0.062	0.059	0.059	0.002
125 μg	0.054	0.058	0.050	0.054	0.004
62.5 μg	0.048	0.049	0.047	0.048	0.001
1 μg	0.044	0.038	0.040	0.041	0.003
250 ng	0.039	0.040	0.046	0.042	0.003
187.5 ng	0.044	0.044	0.050	0.046	0.003
125 ng	0.050	0.052	0.058	0.053	0.004
62.5 ng	0.057	0.057	0.063	0.059	0.003
0 ng	0.068	0.069	0.072	0.070	0.002

Cuadro 22.
RESULTADOS DE LAS DIVERSAS PRUEBAS CRUZADAS REALIZADAS PARA
ANTISUEROS DE *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*

		DILUCIONES											
		SUSPENSION DE CELULAS 2%	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
<i>Ac. C. albicans</i> VS <i>Ag. C. albicans</i>		+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-
<i>Ac. C. albicans</i> VS <i>Ag. C. neoformans</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ac. var. neoformans</i> VS <i>Ag. var. gattii</i>		++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
<i>Ac. var. gattii.</i> VS <i>Ag. var. neoformans</i>		++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-
<i>Ac. var. neoformans</i> VS <i>Ag. C. albicans</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ac. var. gattii.</i> VS <i>Ag. C. albicans</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ac= anticuerpo
 Ag = antígeno
 VS = en contra de

Figura 2. Espectro de infrarrojo del estándar de Mananas de *Candida albicans*.

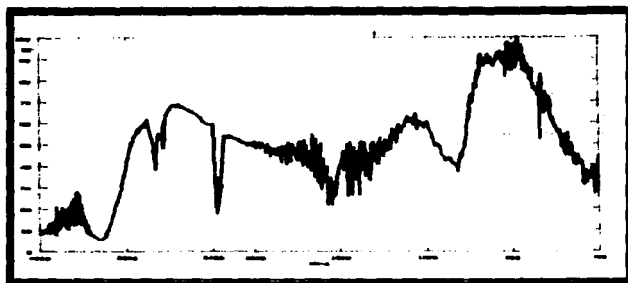


Figura 3. Espectro de infrarrojo de las Mananas obtenidas *Candida albicans*.

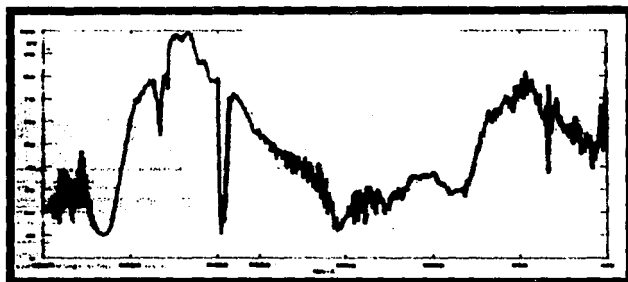


Figura 4. Espectro de infrarrojo del estándar del polisacárido de *Cryptococcus neoformans*.

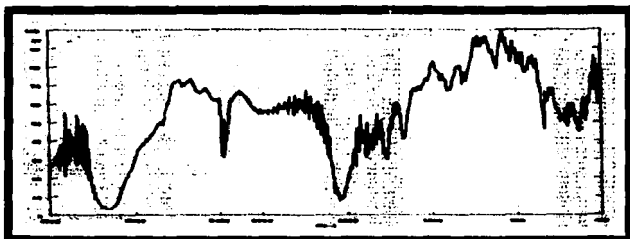


Figura 5. Espectro de infrarrojo del polisacárido obtenido de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

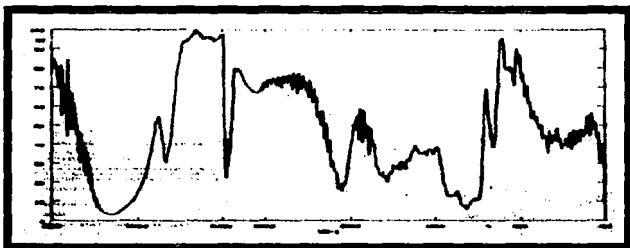


Figura 6. Espectro de infrarrojo del polisacárido obtenido de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.

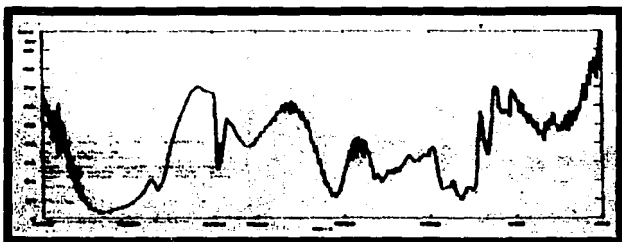


Figura 8

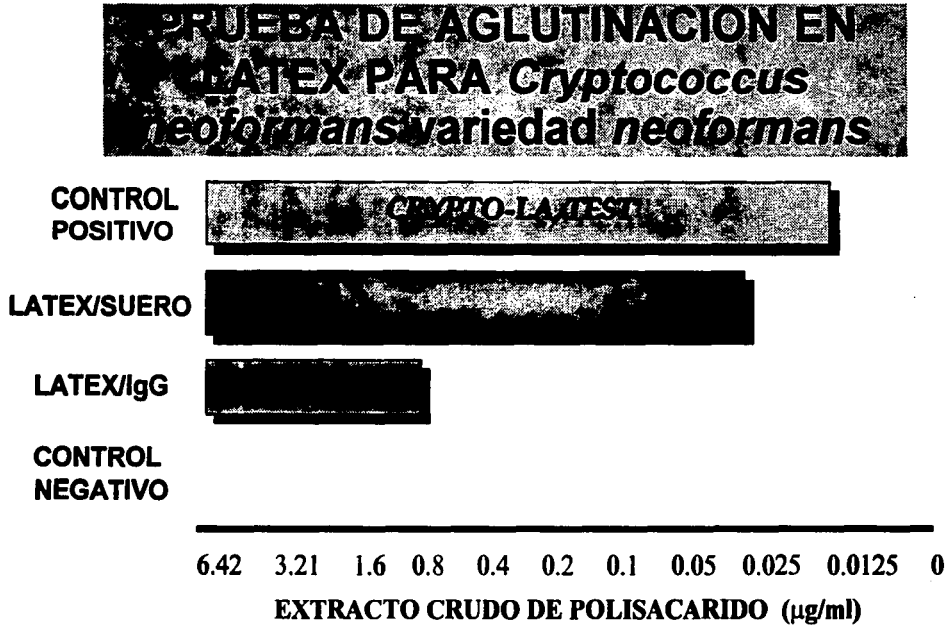


Figura 9

**PRUEBA DE AGLUTINACION EN
LATEX PARA *Cryptococcus
neoformans* variedad *gattii***

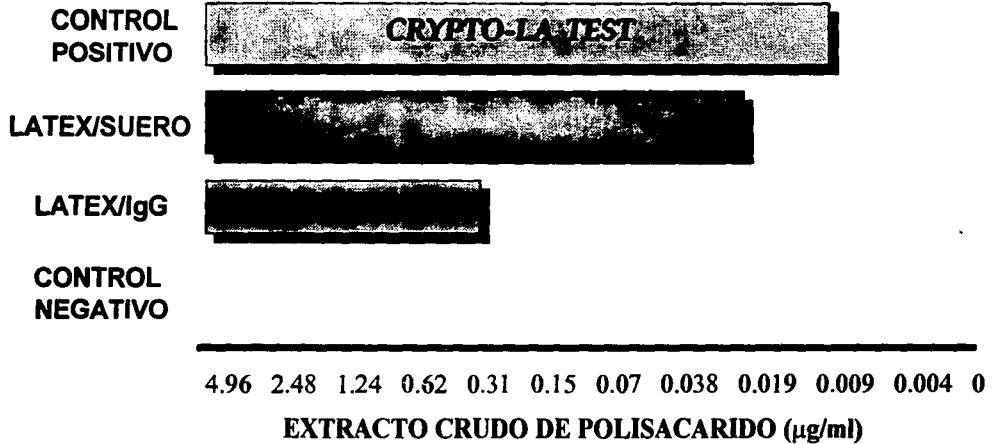
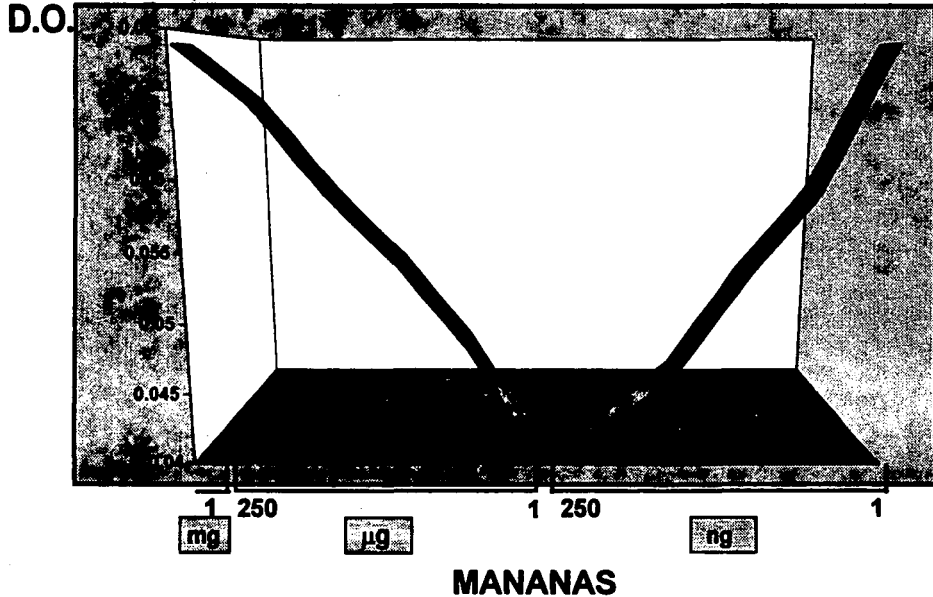


Figura 10

**METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA EVALUAR LA
AGLUTINACION EN LATEX DEL ANTIGENO MANANA DE
*Candida albicans***



8. DISCUSIÓN

8.1. Sobre los resultados de *Candida albicans*:

La concentración de mananas estimada mediante la presencia de carbohidratos (cuadro 8) nos muestra que se obtuvo 40.093 $\mu\text{g/ml}$ siendo un adecuado rendimiento, lo que demuestra el valor de la técnica utilizada (Valdespino, 1988) en comparación con los resultados de Torosantucci y col. (1990) en donde obtuvieron de 4 - 50 $\mu\text{g/mg}$ de peso seco en sus extracciones. Son variables los datos publicados en cuanto a la técnica de Peat et al., 1961 (Saxena, et al. 1990; Torosantucci et al., 1990) donde se presentan mayores rendimientos, sin embargo, la variación hecha por Valdespino (Valdespino, 1988) dá rendimientos idoneos, además de que resulta una metodología rápida y económica.

Para la confirmación de la calidad de las mananas se procedió a realizar un análisis de espectro de infrarrojo, basado en la comparación con un estándar de mananas (Sigma M-3640). Las Figuras 2 y 3 muestran la comparación de ambos estudios, donde la calidad y pureza son similares entre el estándar y el producto extraído por nosotros.

El protocolo de inmunización descrito por Bailey y col. (1985) permite el desarrollo de anticuerpos contra el antígeno manana de la pared de *C. albicans*; resulta importante la forma de producir los anticuerpos, ya que de eso dependerá su reactividad (Bennett, 1987). Inoculaciones múltiples por vía intravenosa de células completas de *C. albicans* muertas, producen en el conejo, anticuerpos preferentemente contra la manana; a diferencia, si se emplean inoculaciones múltiples intramusculares o subcutáneas de células completas ó del citoplasma de *C. albicans*, con o sin adyuvante de Freund, se obtienen anticuerpos contra una antígeno proteico que no reacciona o lo hace debilmente contra la manoproteína.

El cuadro 10 muestra los resultados obtenidos en la producción de anticuerpos, en donde la prueba de Inmunodifusión doble dió títulos de 1:16 y 1:8, mientras que la prueba de aglutinación en placa con células completas se logró obtener títulos de 1: 1024

con el suero hiperinmune, estos títulos son los recomendados para tener una correcta sensibilización de las partículas de látex. (Khan and Jones, 1986).

Al precipitar el suero y separar la fracción y globulínica, se perdió sensibilidad, lo cual podría ser indicativo de una pérdida de inmunoglobulinas durante el proceso de precipitación o bien la fracción globulínica separada no es la que determina la respuesta inmunológica, esta última razón puede explicarse y quizá sea la más valiosa en este caso, ya que la manana es un antígeno timo independiente, por su cualidad de ser un carbohidrato y se reconoce que este tipo de antígenos despiertan una respuesta de anticuerpos IgM principalmente (Arnold, 1981).

La sensibilización de partículas de látex puede realizarse con el suero hiperinmune completo o con la fracción globulínica del mismo, aunque se presenta mejor sensibilización de partículas al utilizar el suero sin precipitar (Khan and Jones, 1986). Los Cuadros 12 y 13 muestran los resultados empleando ambas metodologías, que concuerdan con lo mencionado anteriormente; es así, que la sensibilidad de las partículas recubiertas con suero hiperinmune completo tuvieron mejor resultado.

Resulta importante señalar que la utilización de suero completo evita la autoaglutinación de las partículas de látex sensibilizadas, ya que se sabe que las partículas de látex sensibilizadas con las y globulinas tienden a autoaglutinarse después de 72 horas de almacenamiento, por lo que se recomienda preparar la solución de IgG en un Buffer Salino de Glicina al cual se le adiciona albúmina sérica bovina al 1% para evitar el problema, la albúmina sirve para recubrir las partes no cubiertas de las partículas de látex por anticuerpos.

A partir de las titulaciones, se seleccionó aquella dilución de suero que al recubrir las partículas de látex resultará en la de mayor sensibilidad. La dilución de suero completo seleccionada fue la de 1:2 con la que se alcanza a detectar la cantidad de 15 $\mu\text{g/ml}$ de mananas solubles. En cuanto a la fracción IgG con que se recubrieron las partículas de látex, la elección fue la de emplearse sin diluir, ya que de esta forma sólo se llegó a detectar 35 $\mu\text{g/ml}$.

En el cuadro 18 y figura 7 se puede observar el resultado de los sistemas Látex/suero y Látex/ IgG comparado con controles positivo y negativo. El control negativo no muestra reacción alguna al ser enfrentado a las mananas, éste control se preparo sensibilizando partículas de látex con suero hiperinmune de *Dermatophilus congolensis* . El control positivo empleado fue el contenido en el equipo comercial llamado Candida Latex Test (DIFCO), donde se comprobó la sensibilidad de éste frente a las mananas obtenidas, detectandose 0.1 µg/ml.

La diferencia es notable al compararse con la sensibilidad de nuestros sistemas, sin embargo, es importante el señalar ciertas diferencias como son: la densidad óptica de las partículas sensibilizadas del estuche comercial () 2.0) mayor que la de las partículas sensibilizadas preparadas por nosotros (0.9), dato que probablemente afecto la sensibilidad debido a la mayor cantidad de anticuerpos expuestos; se desconoce el protocolo de inoculación empleado para la obtención de los anticuerpos anti-*C. albicans* del equipo comercial, así como tampoco se menciona en este si son anticuerpos policlonales o monoclonales, o si se empleo algún método de fraccionamiento de las Inmunoglobulinas; se desconoce también el tipo de antígeno utilizado.

Por lo antes mencionado, aún cuando no resulta muy justa la comparación entre la sensibilidad del estuche comercial contra las partículas de látex sensibilizadas en nuestro laboratorio, si representan un parámetro interesante para intentar mejorar las características de nuestro sistema de diagnóstico, ya que este puede aún mejorarse en varios puntos, como son: pureza de antígeno, tipo de anticuerpo empleado (sustituir al policlonal por monoclonal), concentración de partículas de látex, etc.

Con respecto a el reconocimiento específico, el cuadro 22 nos indica que no existe reacción cruzada al enfrentar las partículas de látex sensibilizadas para *C. albicans* contra *Cryptococcus neoformans*, lo que concuerda con otras investigación (Cutler, 1991; Dealler, 1991) Por lo que el reconocimiento específico de la prueba, permite el diagnóstico de enfermedades provocadas por *Candida*.

Con la intención de evaluar la prueba de aglutinación con partículas de látex, se empleo el método de espectroscopia, el cual mediante una evaluación objetiva permite encontrar

el menor punto de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo, este punto no resulta distinguible a simple vista por lo que la lectura del espectrofotometro es indispensable. El cuadro 21 muestra los resultados de la prueba realizada por triplicado, partiendo de una concentración inicial de 1 mg de mananas, con las correspondientes diluciones de ésta. Los datos promedio estan graficados y se muestran en la Figura 10, el comportamiento de esta gráfica señala el punto de equilibrio exacto donde se dá el reconocimiento mínimo antígeno-anticuerpo, siendo de 1 µg/ml, que al momento de ser comparado con el obtenido en placa resulta 14 veces menor, lo que aumenta la posibilidad de detectar menores concentraciones de antígeno además de ser más objetiva debido que no depende de la experiencia del observador.

Las técnicas diagnósticas encaminadas a la detección de *C. albicans* en infecciones sistémicas, siguen empleando como herramienta el uso de la prueba de aglutinación en látex, sin embargo, la búsqueda se sigue centrando en aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba, esto es, se requiere un mejor sistema serodiagnóstico que permita la diferenciación de las especies de *Candida* involucradas en casos clínicos.

Actualmente las perspectivas estan centradas en la posibilidad de emplear un antígeno timo dependiente como lo es la proteína de peso molecular 47 Kd somática (Zöller et al., 1991), para desarrollar una nueva generación de pruebas serodiagnósticas que intenten ser más sensibles y específicas que las disponibles en la actualidad.

8.2. Sobre los resultados de *Cryptococcus*:

El extracto crudo de polisacárido de *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii* se evaluó mediante la técnica de Fenol-Ac.Sulfúrico (Dubois et al., 1954) (Cuadro 8), la cual valoró las cantidades de azúcares presentes; se obtuvo una concentración de 6429 ng/ml para la var. *neoformans* y 4960 ng/ml para var. *gattii*, estos antígenos funcionaron adecuadamente al ser empleados en las pruebas de inmunodifusión doble y aglutinación en placa.

Resulta importante mencionar que existen varias técnicas descritas para la obtención del polisacárido capsular de *C. neoformans* (Cherniak et al., 1982; Turner et al., 1984; Small et al., 1986; Dromer et al., 1987; Sarvamangala et al., 1991; James and Cherniak, 1992) sin embargo, la técnica modificada por nosotros a partir de la de Murphy y colaboradores (1988), dió resultados satisfactorios en cuanto a la cantidad de polisacárido obtenido, además de resultar sencilla, ya que solo emplea métodos de filtración en comparación a la técnica empleada por Cherniak et al., 1980.

La calidad de los antígenos fue demostrada mediante el estudio de espectro de infrarrojo (Figura 4, 5 y 6), existen múltiples similitudes entre la comparación del patrón de Extracto crudo de polisacárido (ECP) de *C. neoformans* (se desconoce la variedad) con los Extractos crudos de polisacárido obtenidos de *C. neoformans* de ambas variedades. Dichas similitudes tan solo nos permiten el decir la coincidencia entre las variedades *neoformans* y *gattii* con el patrón de polisacárido capsular de *C. neoformans*, sin poder percibir gráficamente una clara diferencia entre las variedades que nos permitiese lograr una distinción mediante el análisis de espectro de infrarrojo.

Con el afán de determinar el reconocimiento entre el antígeno y los anticuerpos obtenidos, se procedió a realizar la prueba de inmunodifusión doble en la cual se obtuvo una línea de precipitación bien definida, dandonos un título de 1:8 para ambas variedades; mientras que la prueba de aglutinación en placa nos dió títulos de 1: 2048 para la variedad *neoformans* y 1:1024 para la variedad *gattii* (Cuadro 11), estudios anteriores recomiendan por lo menos un título de 1:1024 para la correcta sensibilización de las partículas de látex.

En los Cuadros 14, 15, 16 y 17, se muestran los resultados obtenidos al enfrentar el ECP contra partículas de látex sensibilizadas con suero hiperinmune completo y con la fracción IgG respectivamente para ambas variedades. Resulta claro que la sensibilidad es sustancialmente afectada cuando se emplean partículas de látex cubiertas con la fracción IgG (Látex/IgG), al ser esta comparada con la sensibilidad mostrada por las partículas de látex cubiertas con suero hiperinmune completo (Látex/suero), la razón de esa diferencia radica en las características del antígeno empleado, el ECP es un carbohidrato que tiende a despertar una respuesta inmunológica preferentemente de IgM. Se sabe que los anticuerpos IgM (aglutininas) son en una proporción de 750 veces más eficientes que las IgG en cuanto a las pruebas de aglutinación (Arnold, 1981), por lo que el reconocimiento es pobre con las IgG's precipitadas, por lo tanto el sistema Látex/suero resulta ser el ideal para las pruebas de aglutinación.

La titulación observada en los Cuadros 14 y 16 dieron la pauta para seleccionar a la dilución 1:2 como la mejor debido a la sensibilidad mostrada, ya que la sensibilidad para la var. *neoformans* fue de 25 ng/ml y para la var. *gattii* 19 ng/ml, en ambos casos también podría considerarse el empleo de la dilución 1:4, sin embargo, esta es menos sensible.

Al hacer la comparación de la sensibilidad entre el estuche comercial Crypto LA-Test y los sistemas Látex/suero y Látex/IgG (Cuadro 19 y Figura 8) para *C. neoformans* var. *neoformans*, se detectó por el Crypto LA-Test hasta una concentración de ECP de 12.5 ng/ml mientras que el sistema Látex/suero determinó 25 ng/ml, mientras que para *C. neoformans* var. *gattii* (Cuadro 20 y Figura 9) el Crypto LA-Test determinó 9 ng/ml y el sistema Látex/suero detectó 19 ng/ml. Por lo que podemos decir que el sistema Látex/suero permite la detección de menores cantidades de ECP de *C. neoformans*, lo que lo hace una herramienta útil en el diagnóstico de la Criptococosis.

El Crypto LA-Test no es específico de variedad, sin embargo mostró menor sensibilidad cuando se enfrentó al ECP de *C. neoformans* var. *neoformans*, por lo que creemos que este estuche de diagnóstico fue preparado con anticuerpos policlonales, la siguiente observación se da a partir de la observación de los resultados de las pruebas cruzadas (Cuadro 22) en donde los anticuerpos policlonales producidos no mostrarán

especificidad de variedad aún cuando si fueron específicos de género y especie, ya que no reaccionaron con *Candida albicans*.

Resultan necesarias más investigaciones que se encaminen al desarrollo de sistemas diagnósticos que permitan el poder realizar, la diferenciación serológica directa de ambas variedades de *Cryptococcus neoformans*, además de lograr superar los problemas que se presentan relacionados al diagnóstico de la Criptococosis: como es la existencia de falsos positivos debido a la existencia del antígeno Rh y a la formación de complejos antígeno-anticuerpo que interfieren en el diagnóstico serológico de esta enfermedad.

9. CONCLUSIONES

Los métodos de obtención de polisacáridos (mananas y extracto crudo de polisacárido) tanto de *Candida albicans* como de *Cryptococcus neoformans* resultaron satisfactorios, siendo éstos de rápido y económico desarrollo lo que permite emplearlos para posteriores estudios en donde se requiera de estos polisacáridos.

La utilización del suero hiperinmune completo en las pruebas de aglutinación en látex, permite una mejor reacción de las partículas sensibilizadas en el reconocimiento del antígeno empleado (mananas de *Candida albicans* y extracto crudo del polisacárido de *Cryptococcus neoformans*). Por lo que el método de aglutinación con partículas de látex es una alternativa para el diagnóstico de infecciones sistémicas causadas por *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

La evaluación de la aglutinación mediante espectrofotómetro es una herramienta adicional que permite tener una interpretación más objetiva en cuanto al reconocimiento del antígeno manana de *C. albicans*.

Se requieren aún varios proyectos de investigación en donde se mejore las pruebas diagnósticas mencionadas: consideración de la naturaleza del antígeno, empleo de anticuerpos monoclonales y validación a nivel de campo, intentando desarrollar una nueva generación de pruebas serodiagnósticas más sensibles y específicas.

10. BIBLIOGRAFIA

- Anderson, R.M.; May, R.M.: (1992). Understanding the AIDS pandemic. *Scientific American*. 266 (5), 58-66.
- Arnold, W.N.: (1981). *Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics and ultrastructure*. CRC Press. Boca Ratón, USA.
- Ashman, R.B.; Papadimitio, J.M.; Ott, A.K.; Warmington, J.R.: (1990). Antigens and immune responses in *Candida albicans* infection. *Immuno. Cell. Biol.* 68, 1-13.
- Bailey, J.W.; Sada, E.; Brass, C. and Bennett, J.E.: (1985). Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 21 (5), 749-752.
- Bennett, J.E. and Bailey, J.W.: (1971). Control for rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 56, 360-365.
- Bennett, J.E.: (1987). Rapid Diagnosis of Candidiasis and Aspergillosis. *Rev. Infect.Dis.* 9, 398-402.
- Bloomfield, N.; Gordon, M.A. and Elmendorf, D.F. (1963). Detection of Cryptococcus neoformans antigen in body fluids by latex particle agglutination. *Proc. Soc.Biol. Med.* 114: 64-67.
- Bouali, A.; Robert, R.; Tronchin, G. and Senet, J.M.: (1987). Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ-tubes and mycelium of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 133, 545-551.
- Bonifaz, A.: (1990). *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez Cervantes. México, D.F.
- Borg, M. and Rùchel, R.: (1988). Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida sp* during experimental infection of oral mucosa. *Infection and Immunity*. 56, 626-631.
- Bougnoux, M.; Hill, C.; Moissenet, D.; Fuilhade, M.; Bonnay, M.; Vicens-Spravel, I.; Pietri, F.; Mc Neil, L.K.; Duouy-Carnet, J.; Bohuon, C.; Andreumont, A.: (1990). Comparison of antibody, antigen and metabolite assays for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis. *Journal Clin. Microbiol.* 28 (5), 905-909.
- Bradford, M.M.: (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-256.

Brawner, D.L. and Cutler, J.E.: (1989). Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised, patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *Journal Clin. Microbiol.* 27, 1020-1025.

Bulmer, G.S.; Sans, M.D.: (1967). *Cryptococcus neoformans*. II. Phagocytosis by human leucocytes. *J. Bacteriol.* 94, 1480-1483.

Bulmer, G.S.; Sans, M.D.: (1968). *Cryptococcus neoformans*. III. Inhibition of Phagocytosis. *J. Bacteriol.* 95, 5-8.

Calderone, R.A.; Cihlar, R.L.; Lee, D.; Hoberg, K. and Scheld, W.H.: (1985). Yeast adhesion in the pathogenesis of endocarditis due to *Candida albicans*: studies with adherence-negative mutants. *Journal of Infectious Diseases.* 152, 710-715.

Calderone, R.A. and Braun, P.: (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* 55, 1-20.

Campbell, M.C. and Stewart, J.L.: (1980). *The Medical Mycology Handbook*. Wiley Medical Publication, John Wiley and Sons. New York, USA.

Campos, C.G.: (1991). Candidiasis vulvovaginal (Especies involucradas, correlación con signos y síntomas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México.

Carrillo, T.C.: (1990). SIDA: El nuevo rostro de Gorgo. *Ciencias.* 19, 43-59.

Casanova, M.; Gil, M.L.; Cardeñoso, L.; Martínez, J.P. and Santandreu, R.: (1989). Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infection and Immunity.* 57 (1), 262-271.

Casanova, M.; Martínez, J.P. and Chaffin, W.L.: (1991). Identification of germ tube cell wall antigens of *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 29, 269-272.

Chaparro, R.J.: (1993). Estandarización de la prueba de aglutinación con partículas de látex para el diagnóstico de antígeno circulante en infecciones por *Candida albicans*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México, UNAM.

Chaskes, S. and Tyndall, R.L.: (1975). Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from *para* and *ortho*-diphenols: effect to the nitrogen source. *Journal Clin. Microbiol.* 1, 509-514.

- Cherniak, R.; Reiss, E.; Slodki, E.M.; Plattner, D.R. and Blumer, O.: (1980). Structure and antigenic of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* seotype A. *Molecular Immunology*. 17, 1025-1032.
- Cherniak, R.; Reiss, E. and Turner, S.H.: (1982). A Galactoxylomannan antigen of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Carbohydrate Research*. 103, 239-250.
- Clement, M.J.: (1994). Situación de la enfermedad causada por VIH. *Atención Médica*. 7 (3), 4-6.
- Critchley, I.A. and Douglas, L.T.: (1987). Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 133, 629-636.
- Cutler, J.E.: (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 187-218.
- Dealler, S.F.: (1991). *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. *Journal of Clinical microbiology*. 29 (5), 1081-1082.
- Denning, D.W.; Stevens, D.A. and Hamilton, J.R.: (1990). Comparison of *Guizotia abyssinica* seed extract (Birdseed) agar with conventional media or selective identification of *Cryptococcus neoformans* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal Clin. Microbiol.* 28 (11), 2565-2567.
- De Repentigny, L; Reiss, E.: (1984). Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. *Rev. Infect. Dis.* 6, 301-312.
- Diamond, R.D., and Bennett, J.E.: (1973). Disseminated cryptococosis in man: decreased lymphocyte transformation in response to *Cryptococcus neoformans*. *J.Infect. Dis.* 127,694-697.
- Diamond, R.D.: (1977). Effects of stimulation and suppression of cell-mediated immunity on experimental cryptococosis. *Infect. Immun.*, 17,187-194.
- Dismukes, W.E.: (1988). Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Journal Infect. Dis.* 157, 628-630.
- Doskeland, S.D. and Berdal, B.P.: (1980). Bacterial antigen detection in body fluids: method for rapid antigen concentration and reduction of non-specific reactions. *Journal Clin.Microbiol.* 11,380-384.
- Douglas, L.I.: (1987). Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *C.R.C.* 15 (1), 24-43.

- Dromer, F.; Salamero, J.; Contrepois, A.; Carbon, C. and Yeni, P.:** (1987). Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infection and Immunity*. 55, 742-748.
- Dubois, M.; Gilles, K.A., Hamilton, J.A.; Roberts, P.A. and Smith, F.:** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Ellis, D.H.:** (1987). *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in Australia. *Journal Clin. Microb.* 25, 1642-1644.
- Ellis, D.H. and Pfeiffer, T.J.:** (1990). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28, 1642-1644.
- Ellis, D.H.:** (1994) *Clinical micology the human opportunistic mycoses*. Pfizer.
- Emmons, W.H. and Utz, J.R.:** (1970). *Medical Mycology* 3erd. edition.
- Eng, R.H.K.; Bishburg, E.; Smith, S.M. and Kapila, R.:** (1986). Cryptococcal infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am.J.Med.* 81, 19-23.
- Franklyn, K.M.; Warmington, J.R.; Ott, A.K. and Ashman, R.B.:** (1990). An immunodominant antigen of *Candida albicans* shows homology to the enzyme enolase. *Immunol. Cell. Biol.* 68, 173-178.
- Fung, J.C.; Donta, S.T. and Tilton, R.C.:** (1986). *Candida* detection system (Cand-tec) to differentiate between *Candida albicans* colonization and disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 24 (4) 542-547.
- Gil, M.L.; Casanova, M.; Martínez, J.P. and Santandreu, R.:** (1991). Antigenic Cell Wall mannoproteins in *Candida Albicans* isolates and in other *Candida* Species. *Journal of General Microbiology*, 137, 1053-1061.
- Hatch, T.F.:** (1961). Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract. *Bacteriol. Rev.* 25: 237-240.
- Hebert, G.A.; Pittman, B.; McKinney, R.M. and Cherry, W.B.:** (1972). The preparation and physicochemical characterization of fluorescent antibody reagents. U.S. Department of Health, Education and Welfare Public Health Service.
- Hurley, R. and De Louvois J.:** (1979). *Candida* vaginitis. *Postgrad. Med. J.* 55, 645-647.
- James, P.G. and Cherniak, A.A.:** (1992). Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 60 (3), 1084-1088.

Kabasawa, K.; Itagaki, H.; Ikeda, R.; Shinoda, T.; Kagaya, K. and Furazawa, Y. (1991). Evaluation of a new method for identification of *Cryptococcus neoformans* which uses serologic test aided by selected biological tests. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2873- 2876.

Kennedy, M.J.; Volz, P.A.; Edwards, C.A. and Yancey, R.I. (1987). Mechanism of association of *Candida albicans* with intestinal mucosa. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 23, 333-341.

Kennedy, M.J., Calderone, R.A.; Cutler, J.E, Kanabe, T.; Reisselman, M.H.; Robert, R.; Senet, I.M.; Annaix, V.; Bovali, A.; Mahaza, C.; Tronchin, G.; Bouchara, J.P.; Miegerville, M.; Marot-Lebrand, A. and Segal, E.; (1992).: Molecular basis of *Candida albicans* adhesion. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 30, 95-122.

Khan, F.W. and Jones, J.M.: (1986). Latex agglutination test for detection of *Candida* antigens in sera of patients with invasive candidiasis. *Journal Infect. Dis.* 153, 579-585.

Kiehn, T.E.; Edwards, F.F. and Armstrong, D.: (1980). The prevalence of yeast in clinical specimens from cancer patients. *Am. J. Clin. Pathol.* 73, 518-521.

Klotz, S.A.; Drutz, D.J.; Harrison, J.L. and Huppert, M.: (1983). Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeast. *Infect. Immun.* 42, 374-384.

Krivoshein, Y (1989) *Manual práctico de Microbiología médica y diagnóstico de laboratorio de las enfermedades infecciosas*. Edit. Mir, Moscú, U.R.S.S.

Kwon-Chung, K.J.: (1976). A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*. 68, 942-946.

Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I. and Bennet J.E.: (1982). Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* 15 (3): 535-537.

Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E.: (1988). Distribution of alpha and mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *American Journal of Epidemiology*. 108, 337-340.

Kwon- Chung, K.J.; Wickes, B.L.; Stockman, L.; Roberts, G.D.; Ellis, D. and Howard, D.H.: (1992). Virulence, serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infection and Immunity*. 50 (5), 1869-1874.

Lee, K.W. and Balish, E.: (1983). Systemic candidiasis in silica-treated athymic and euthymic mice. *Infection and Immunity*. 41, 902-907.

Lemieux, C.; St. German, G.; Vincelette, J.; Kaufman, L. and Repentigny, L.: (1990). collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test an enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis. *Journal Clin. Microbiol.* 28, 249-253.

Lim P.L. and Fox, Y.: (1987). Detection of group D salmonellae in blood culture broth and of soluble antigen by tube agglutination antibody latex conjugate. *Journal of Clinical Microbiology.* 25 (7), 1165-1168.

Lim, P. and Choy, W: (1988). A Spectrophotometric method for evaluating a latex agglutination assay of *Salmorella typhi* lipopolysaccharide. *Journal of Immunological Methods* 115, 269-274.

Li, R.K. and Cutler, J.E.: (1991). A cell surface/ plasma membrane antigen of *Candida albicans*. *Journal General Microbiol.* 137, 455-464.

Macdonald, F. and Odds, F.C.: (1980). Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *Journal of Medical Microbiology.* 13, 423-435.

Marconi, P.; Scaringi, L. Tissi, L.; Bocconera, H.; Bistoni, F.; Bonmassa, E. and Cassone, A.: (1985). Induction of natural killer cell activity by inactivated. *Candida albicans* in mice. *Infect. Immun.* 50, 297-303.

Marrie, T.J. and Costerton, J.W.: (1981). The ultrastructure of *Candida albicans*: Isolation, analysis and role in adhesion. *Journal of General Microbiology.* 131, 495-503.

Martinez, J.P.; Gil, M.L.; Casanova, M.; López-Ribot, J.L.; García de Lomas, J. and Setandreu, R.: (1990). Wall manoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*. *Journal General Microbiol.* 136, 2421-2432.

Melbye, M.; Schonheyder, H.; Kestens, L.; Stenderup, A. Gigase, P.L.; Ebbesen, P. and Biggar, R.J.: (1985). Carriage of oral *Candida albicans* associated with a high number of circulating suppressor, T lymphocytes. *J. infect. Dis.* 152, 1356-1357.

Miyakawa, Y.; Kagaya, K.; Fukazawa, Y. and Soe, G.: (1986) Production and characterization of agglutinating monoclonal antibodies against predominant antigenic factors for *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology.* 23, 881-886.

Morrison, R.T. and Boyd, R.N (1987) *Química Orgánica*. 4a. Addison. Wesley Iberoamericana, México, D.F., México.

Müchmore, H.G.; Felton, F.G, and Scott, E. N.: (1980) Comparison of enzyme Immunoassay and latex agglutination methods for detection of *Cryptococcus neoformans* antigen. *Am. J. of Clin.* 12, 124-128.

Murphy, J.W.; Mosley, R.L.; Cherniak, R.; Reyes, G.H.; Kozel, T.R. and Reiss, E.: (1988). Serological, electrophoretic, and biological properties of *Cryptococcus neoformans* antigens. *Infection and Immunity.* 56 (2), 424-431.

Myerowitz, R.L.; Pazin, G.J.; Allen, C.M.: (1977). Disseminated candidiasis. Changes in incidence, underlying diseases and pathology. *Am. J. Clin. Pathol.* 68, 29-38.

Nugent, K.M. and Onofrio, J.M.: (1984). Pulmonary clearance of *Candida albicans* in neutropenic mice. *J. Infect. Dis.* 149,1020.

Odds, F.C.: (1979). *Candida* and *Candidosis*. Leicester University. Park Press. Baltimore, USA.

Odds, F.C. and Abbott, A.B. (1980). A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabourandia.* 18(4): 301-317.

Odds, F.C.: (1988). *Candida* and *Candidosis*. A review and Bibliography. Baillière Tindall, England.

Peat, S.; Whelam, J. and Edwards, T.E.: (1961). Polysaccharide of baker's yeast. Part IV. Mannan. *J. Chem. Soc.* 29-34.

Pfeiffer, T.J.; and Ellis, D.H.: (1991). Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. *Journal Infect. Dis.* 163, 929-930.

Phillips, P.; Dowd, A.; Jewesson, P.; Radigan, G.; Tweeddale, M.G.; Clarke, A.; Gere, I and Kelly, M.: (1990). Nonvalue of antigenic detection immunoassays for diagnostic of candidemia. *Journal Clin. Microbiol.* 28, 2320-2326.

Pike, I.H.; Evans, E.G.V. and Carney, J.A.: (1991). Mannan estimation as a measure of the growth of *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 29, 83-91.

Powel, K.E.; Dahl, B.A.; Weeks, R.J. and Tosh, F.E.: (1972). Airbone *Cryptococcus neoformans*: particles from pigeon excreta comparable with alveolar deposition. *J. Infect. Dis.* 125: 412-415.

Reiss, E.; Hearn, V.M.; Poulain, D. and Shepherd, M.G.: (1992). Structure and function of the fungal cell wall. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 30, 143-156.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Rendón, Ma.C.J.: (1986). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excreta de paloma y gallina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México., UNAM.

Rippon, J.W.: (1982). *Medical Mycology*. 2nd. edition. W.B. Saunders. Philadelphia, USA.

Rippon, J.W.: (1988) *Medical Mycology*. 3rd. edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA.

Rüchel, R.; Boning, B. and Borg, M.: (1976). Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilopsis* and evidence for the absence of the enzyme during infection *in vitro*. *Infection and Immunity*. 53, 411-419.

Rüchel, R.; De Bernardis, F.; Ray, T.L.; Sullivan, P.A. and Cole, G.T.: (1992). *Candida* acid proteinases. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 30, 123-132.

Sandford, G.R.; Merz, W.G.; Wingard, J.R.; Charache, P. and Sarol, R.: (1980). The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections. *J.Infect. Dis.* 142, 503-509.

Sarvamangala, J.N.; Schneerson, R.; Egan, W.; Ulrich, T.J.; Bryla, D.; Robbins, J.B. and Bennett, J.E. : (1991). *Cryptococcus neoformans* serotype A Glucuronoxylomannan protein conjugate vaccines: synthesis, characterization and Immunogenicity. *Infection and Immunity*. 59, 3700-3707.

Saxena, A.; Mac Elhanev-Feser, G.E. and Cihlar, R.L.: (1990). Mannan composition of the hyphal form of two relatively avirulent mutants of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 58 (7), 2061-2066.

Schmid, J; Voss, E. and Soll, D.R.: (1990). Computer assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by finger printing with the moderately repetitive sequence, Ca3. *Journal of Clin. Microbiol.* 28, 1236-1243.

Scott, E.N.; Muchmore, H.G. and Felton, F.G.: (1980) Comparison of enzyme immunoassay and latex agglutination methods for detection of *Cryptococcus neoformans* antigen. *American Journal of Clinical Pathology*. 73 (6) 790-794.

Segundo, Z.C.: (1991). Manual teórico práctico de micología médica para la carrera de Q.F.B. (prácticas y alternativas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo de México. U.N.A.M.

Sheperd, M.G.: (1985) Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect. Immun.* 50, 541-544.

Small, J.M.; Mitchell, T.G. and Wheat, R.W.: (1986). Strain variation in composition and molecular size of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Infec. Immun.*: 54, 735-741.

Smith, D.L. and Rommel, F.: (1977). A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic microbiocidal activity of human peripheral blood leukocytes *in vitro*. *Journal of Immunological Method.*: 17, 241-247.

Smith, J.M.B.: (1989). Opportunistic mycoses of man and other animals. CAB. International, Wallingford, U.K.

Staib, F.: (1986). Detection of *Cryptococcus neoformans* in biopsy specimens from the spleen and the liver of AIDS patients: critical comments. *Mycosen*, 29, 551-555.

Staib, F.: (1987) Cryptococcosis in AIDS-Mycolological diagnostic and epidemiological observations. *AIDS-Forschung*, (AIFO). 2, 363-382.

Staib, F.; Seibold, M.; Lage, M.; Heise, W.; Skorde, J.; Grosse, G.; Nurnberger, F. and Bauer, G.: (1989). *Cryptococcus neoformans* in the seminal fluid of an AIDS patient a contribution to the clinical course of cryptococcosis. *Mycosen*. 32 (4), 171-180

Stiller, R.L.; Bennett, J.E.; Scholer, H.J.; Wall, M.; Polak, A. and Stevens, D.A.: (1982). Susceptibility to fluorocytosine and prevalence of serotype in 402 *Candida albicans* isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 22, 482-487.

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.

Sundstrom, P.M.; Tam, M.R.; Nichols, E.J. and Kenny, G.E.: (1988). Antigenic differences in the surface mannoproteins of *Candida albicans* as revealed by monoclonal antibodies. *Infec. Immun.* 56, 601-606.

Swinne-Desgain, D.: (1975). *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Saboraudia* 13: 303-308.

Thomas, M.: (1986) Agglutination methods for rapid analysis. *Nature*. 320 (20), 289-290.

Torosantucci, A.; Palma, C.; Boccanera, M.; Austello, C.M.; Spagnoli, G.C. and Cassone, A.: (1990) Lymphoproliferative and cytotoxic responses of human peripheral blood mononuclear cells to mannoprotein constituents of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 136, 1421-1428.

Turner, S.H.; Cherniak, R. and Reiss, E.: (1984). Fractionation and characterization of galactoxylomanan from *Cryptococcus neoformans*. *Carbohydrate Research*. 125, 343-349.

Valdespino, A.:(1988). Extracción del principal antígeno de pared celular de *Candida albicans* y preparación del suero hiperinmune para su diagnóstico. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo de Méx. UNAM.

Zöller, L.; Krämer, I.; Kappe, R. and Sonntag, H. G.: (1991) Enzyme immunoassays for invasive *Candida* infections Reactivity of somatic antigens of *Candida albicans*. *Journal Clin. Microbiol.* 29, 1860-1867.