



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENOS PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TIPIFICACION DE CEPAS DE *Cryptococcus*
neoformans var. *neoformans* Y var. *gattii* AISLADAS
DE CASOS CLINICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MA. DEL CARMEN ALDANA MEDINA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

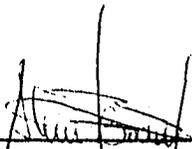
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

JURADO ASIGNADO

Presidente	Profesor: Manuel Wong Chio
Vocal	Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
Secretario	Profesor: José Alejandro Bonifaz Trujillo
1er. suplente	Profesor: Misael González Ibarra
2do. Suplente	Profesor: Norma Angélica Castellanos Chávez

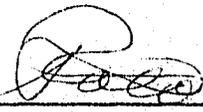
Sitio donde se desarrollo el tema

Hospital General de México, Servicio de Dermatología, departamento de Micología y Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, departamento de Inmunología y Microbiología.



Aesor de tema

M en C José Alejandro Bonifaz T.



Supervisor técnico

Dr. Roberto Cervantes Olivares



Sustentante

Ma. del Carmen Aldana Medina

A mi asesor y jurado asignado.

Conocimiento, dedicación, trabajo, constancia, paciencia, prestancia, carisma, esto y más es mi asesor. Gracias **Alexandro Bonifaz**. Todavía queda mucho por recorrer de ese triángulo de la vida .

Al jurado asignado, por permitirme llegar a la conclusión de este trabajo.

A mi familia

A mis padres, que me han brindado todo su amor y apoyo.

A mis hermanos, especialmente a mi hermanito Miguel, porque se que sin él, esto jamás podría haber llegado a su fin. Sigue adelante, que llegarás muy lejos, te quiero!

A mis amigos y compañeros de la Gloriosa Facultad de Química.

Por todo lo que hemos vivido y lo que nos resta por vivir juntos, para: Tere, Caludia, Adolfo, Pablo, David, Omar, Riger, Tomy, Carlitos, Adriana.

Por los días de estudio, de fútbol, de desvelos (no presisamente por el estudio), para: Verónica, Clau, Chuco, Sandra, Moni.

A los amigos de siempre: Adriana y Saúl

Gracias por todo: Mary Paz, Javier, Lupita.

Por esos momentos inolvidables, llenos de alegrías y tristezas, para tí Alma.

**Un agradecimiento especial a Carolina Segundo por su amistad, cariño
y apoyo en todos los sentidos**

A tí... que no necesito decir tú nombre porque te llevo dentro dentro de mi y que por más que yo escribiera en este momento, no sería nada comparado realmente con lo que tú eres, pero se... que no hay otro lugar en donde yo me venga, a donde yo vaya, mejor que tú... te amo.

Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Criptococosis	4
2.2 Descripción del patógeno	7
2.3 Aspectos epidemiológicos	11
2.4 Diagnóstico	14
2.4.1 Toma de muestra	14
2.4.2 Procesamiento de las muestras	14
2.4.3 Tinción negativa	14
2.4.4 Cultivo	15
2.4.5 Medio de Canavanina-glicina-azul de bromotimol	15
2.4.6 Inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA	16
2.4.7 Asimilación de D-prolina como única fuente de nitrógeno	16
2.5 Impacto social	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos particulares	19
4. PARTE EXPERIMENTAL	20
4.1 Diagrama general de trabajo	21
4.2 Obtención de muestras	22
4.3 Tratamiento de las muestras	23
4.4 Aislamiento	23
4.5 Pruebas de identificación de género y especie	23
4.5.1 Desarrollo de medio de niger	23
4.5.2 Prueba de ureasa	24
4.5.3 Método estandarizado de identificación API-20C	24

4.6 Pruebas de identificación de variedad	24
4.6.1 Siembra en medio de Canavanina-glicina-azul de bromotimol	25
4.6.2 Prueba de la inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA	25
4.6.3 Asimilación de D-prolina como única fuente de nitrógeno	25
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSIÓN	33
7. CONCLUSIONES	36
8. APENDICE	38
8.1 Preparación de medios y reactivos	39
8.1.1 Medio de Sabucreaud-dextrosa-agar	39
8.1.2 Medio de niger	39
8.1.3 Medio de urea de Christensen	40
8.1.4 Método estandarizado de identificación API-20C	40
8.1.5 Medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol	41
8.1.6 Caldo urea rápido (Broth-RUH)	42
8.1.7 Medio glucosa-peptona-extracto de levadura (YEPG)	42
8.1.8 Medio glucosa-peptona-extracto de levadura (YEPGE)	43
8.1.9 Medio Yeast-carbon-base (YCB) sin aminoácidos	43
8.1.10 Discos de D-prolina	44
8.2 Técnicas de tinción	45
8.2.1 Tinción de Gram	45
8.2.2 Tinción negativa	45
8.3 Técnica de la prueba de patogenicidad en ratón	45
9. BIBLIOGRAFIA	47

1. INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

La infección causada por una levadura capsulada llamada *Cryptococcus neoformans*, es conocida por criptococosis. La infección primaria ocurre cuando la levadura penetra por vía respiratoria al huésped. Cabe mencionar que no sólo *C. neoformans* es la única especie de su género capaz de provocar la infección. No se ha demostrado la transmisión de persona a persona y no existe relación con la edad, la raza y el sexo⁴.

La criptococosis es una micosis profunda; que representa un problema de salud mundial, ya que es un padecimiento que ha tenido un incremento en los últimos años. Esto debido a que el causante de la infección, *C. neoformans*, es un microorganismo considerado oportunista; como consecuencia existen factores de riesgo determinante en el paciente para padecer la enfermedad, como son: síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), terapias con corticosteroides, transplantes de órganos, leucemias y linfomas. Observándose que los factores antes mencionados tienen como característica en común, una inmunosupresión que disminuye las defensas del huésped y lo hace vulnerable a la infección²⁴.

A nivel mundial se ha observado que *C. neoformans* var. *neoformans* es causante de la mayoría de los casos de criptococosis; sin embargo en México se han encontrado casos donde la variedad *gattii* es la causante de la enfermedad.⁷

2. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

2.1. CRIPTOCOCOSIS

La criptococosis es una enfermedad micótica de curso crónico o subagudo, causada por un microorganismo levaduriforme, *Cryptococcus neoformans*. La infección primaria casi siempre es pulmonar, después de la inhalación de las levaduras; aunque se ha sugerido que las basidiosporas, producto de la fase sexual de *C. neoformans*, es la real forma de infección; remarcando su impacto principal en el sistema nervioso central (SNC). Aislamientos de *C. neoformans* que miden entre 0.6-3.5 μm (micrómetros) de diámetro, son considerados con la medida ideal para la depositación alveolar.^{4,31}

La mayoría de los casos de criptococosis, son el resultado de fallas en las defensas del huésped, al inhalar aerosoles que contienen a las partículas levaduriformes infectantes. Es por ello, que este padecimiento ha tenido un incremento en años recientes, debido a la frecuencia de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), terapia con corticosteroides, trasplantes. Littman y Zimmerman^{25,31}, encontraron que durante un periodo de 55 años, se reportaron 300 casos a nivel mundial, mientras que Kaufman y Blumen^{25,31} en 1978, estimaron que simplemente en los Estados Unidos, la frecuencia de la enfermedad variaba de 200 a 400 casos por año. Dejando de ser de este modo una enfermedad rara y pasando a ser sin duda una de las micosis sistémicas más prevalentes.

Así, la criptococosis tiene un espectro clínico que se ha clasificado en cinco tipos:

- Pulmonar
- Sistema Nervioso Central. Que se puede presentar como meningitis, meningoencefalitis o criptococoma.
- Cutánea.
- Visceral.
- Osea.

A las tres últimas formas clínicas, se les ha englobado en la forma de criptococosis **diseminada**.⁴

Cuando se establece la levadura en los alvéolos pulmonares, se realiza la síntesis de material capsular, en caso de necesitarse como un factor de virulencia. El padecimiento cursa muchas veces de forma asintomática, pero este se extiende de forma gradual hacia otros tejidos, por vía linfática y hematogena, hasta llegar a SNC. Encontrándose ya en este sitio, se pueden presentar tres tipos de criptococosis; la meningitis que es la más común; la meningoencefalitis en la que se invade tejidos como la corteza cerebral, tallo cerebral y el cerebelo y el criptococoma, que se caracteriza por la localización de una masa sólida parecida a un tumor. La aparición de lesiones cutáneas y mucocutáneas, suelen ser la manifestación de una infección diseminada; se presentan de forma muy variada, lesiones ulcerosas como manifestación primaria, pápulas, nódulos y hasta celulitis en la secundaria; aunque las lesiones cutáneas pueden ser producto de una infección primaria. La criptococosis ósea ocurre en el 10% de los casos diseminados, involucrando prominencias óseas, huesos craneales y vertebrales, provocando lesiones múltiples, destructivas y crónicas. En cuanto a la criptococosis visceral, la levadura se puede encontrar en órganos como el corazón, testículos, próstata, ojos. La levadura también puede ser encontrada en la orina.¹²

La transmisión de persona a persona nunca ha sido demostrada. La exposición al hábitat natural de las dos variedades, así como el tiempo de exposición, parece ser la causa de la enfermedad. La criptococosis se presenta con más frecuencia en el sexo masculino, quizá por la mayor exposición al microorganismo. Por lo que respecta a la raza y la edad, no hay una predisposición especial. Cabe mencionar que la infección asintomática probablemente este bastante difundida.²⁵

Si bien, la frecuencia de criptococosis se incrementa en asociación con leucemia, diabetes, artritis reumatoide; antes de la epidemia de SIDA, aproximadamente en 50% de los casos de criptococosis presentaban defectos reconocibles en las defensas de huésped, la otra mitad de los casos, eran pacientes aparentemente sanos; los cuales posiblemente podían tener sutiles defectos en la habilidad o capacidad de montar una respuesta inmune, que pudiera marcar una predisposición para el desarrollo de esta enfermedad.³¹

En cuanto al tratamiento para la criptococosis, tenemos que el de elección es la anfotericina B, a una dosis de 2 a 3 g cuando el fármaco se utiliza en forma aislada. La combinación de dosis bajas de anfotericina B (0.3 mg / Kg / día) y 5-fluorocitosina (150 mg / Kg / día dividida en cuatro días) durante un periodo de seis semanas, proporciona resultados mejores que el tratamiento convencional con anfotericina B; esto debido a que se crea un efecto sinérgico, que da como resultado un aumento de la potencia y como consecuencia una disminución de la toxicidad.⁴ Dentro del tratamiento tenemos que los azoles como el ketoconazol e itraconazol a 400 y 200 mg/día respectivamente, son útiles para casos pulmonares o cutáneos; sin embargo como no atraviesan la barrera meníngea no se pueden utilizar para los casos de criptococosis del SNC.

El fluconazol de reciente creación, tiene efectos sobre *C. neoformans*, además de que sí atraviesa la barrera meníngea. Ofrece pocos efectos secundarios y se administra a una dosis que fluctúa de 50-150 mg/día, por vía oral y es también recomendable asociarlo a anfotericina B.⁴¹⁵

Si bien, el uso de medicamentos como los antes mencionados, ofrecen un efecto terapéutico sobre los pacientes que padecen de criptococosis, el éxito de esto, dependerá en gran medida de la rapidez con que realice el diagnóstico, además del estado inmune del paciente.

2.2. DESCRIPCION DEL PATOGENO

Como ya se ha mencionado, el agente etiológico de la criptococosis es *C. neoformans* que es una levadura capsulada, de la cual se ha encontrado un estado perfecto o sexual designado *Filobasidiella neoformans*, la cual bajo condiciones *in vitro* produce hifas y basidiosporas.¹⁷

La clasificación taxonómica de *C. neoformans* en sus dos estados, anamorfo y telemorfo, es la siguiente.⁴ Tabla 2.2.1

TABLA 3.1. CLASIFICACIÓN TAXONOMICA PARA LOS DOS ESTADOS DE *C. neoformans*.

	Fase anamorfo	Fase telemorfo
Clase	<i>Deuteromyces</i>	<i>Basidiomycetes</i>
Subclase	<i>Blastomycetidiæ</i>	<i>Teliomycetidiæ</i>
Orden	<i>Cryptococcales</i>	<i>Ustilaginales</i>
Familia	<i>Cryptococaceæ</i>	<i>Ustilagenaceæ</i>
Género	<i>Cryptococcus</i>	<i>Filobasidiella</i>
Especie	<i>neoformans</i>	<i>neoformans</i>
Variedades	<i>gattii</i> y <i>neoformans</i>	<i>gattii</i> y <i>neoformans</i>

Dentro del género *Cryptococcus* se encuentran incluidas 19 especies.³¹ Si bien el agente etiológico de la criptococosis es el *C. neoformans*, se han reportado casos de criptococosis en donde el agente casual es otra especie, como *C. albidus*, *C. laurentii* y *C. unigutulatus*.¹²

Tomando como base los determinantes antigénicos polisacáridicos de la cápsula de *C. neoformans*, Evans en 1949 determinaron 4 serotipos: A, B, C y D.^{14,35} Kwon-Chung y cols. en 1984 realizaron estudios sobre aspectos ecológicos y epidemiológicos, además de pruebas bioquímicas y genéticas, donde observaron que entre los serotipos A,D y B,C respectivamente, presentaban similitudes²⁰. De este modo se han establecido 2 variedades de *C. neoformans*; variedad *neoformans* (serotipos A y D) y variedad *gattii* (serotipos B y C).^{16,33}

En la observación microscópica de muestras clínicas, *C. neoformans* se presenta como una levadura capsulada oval o circular, donde la célula levaduriforme por sí misma llega a medir de 4 a 6 μm , aproximadamente. La cápsula de polisacáridos que le rodea puede medir desde 1 hasta 30 μm .²⁷ Si la observación microscópica que se realiza, es de muestras provenientes de aislamientos en la naturaleza , el microorganismo tiende a ser pequeño (1.1 a 3.3 μm de diámetro) y de pobre cápsula (de 1 a 1.5 μm).²⁸

La cápsula que envuelve al *C. neoformans* esta constituida de glucanas, que es un polisacárido llamado glucoroxilomanana compuesto de manosa, xilosa, ácido glucurónico y de O-acetil.^{3,9}

C. neoformans es un hongo monomórfico, es decir, que tanto en su estado parasitario como vegetativo, presenta la misma morfología: levadura capsulada. Además no produce pseudomicelio ni clamidoconidios (clamidosporas) y en suero no forma tubo germinativo.^{33,31} En lo que se refiere a su desarrollo en medios de cultivo; *C. neoformans* puede cultivarse sin dificultad sobre agar chocolate, agar infusión cerebro corazón o sobre medios micológicos habituales como el medio agar Sabouraud dextrosa (SDA). Es importante mencionar que es inhibido por la cicloheximida. Cuando el cultivo de *C. neoformans* se realiza en SDA, se observa el desarrollo de colonias convexas, mucoides, de color crema, con apariencia de leche condensada.⁴

C. neoformans se desarrolla bien a 37 y 40 °C, lo que permite diferenciarlo de otras especies del género; además, cuando *C. neoformans* es cultivado en medios que contienen como sustrato compuesto polifenólicos, se observa la producción de pigmentos melanínicos; lo que se traduce en el desarrollo de colonias café oscuro; esto sucede cuando *C. neoformans* se inocula en el medio de niger, el cual contiene extracto de semillas de *Guizotia abyssinica*, las cuales otorgan al medio el ácido cafeínico (compuesto polifenólico), que se transforma en un compuesto polimérico similar a la melanina. La enzima responsable de la producción de este pigmento es la fenoloxidasas.^{23,19} Se ha observado que no sólo *C. neoformans* es capaz de producir dicho pigmento; ya que pruebas realizadas en el laboratorio muestran que otras especies del género también lo producen, pero en menor cantidad.

Anteriormente se han mencionado características propias del género *Cryptococcus*; pero existen otras como: producción de ureasa, asimilación de nitratos y carbohidratos, así como su virulencia sobre el ratón, que ofrecen la posibilidad de diferenciar a este género de otras levaduras patógenas (ver tabla 2.2.2).^{15,33}

TABLA 2.2.2. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS GÉNEROS DE LEVADURAS FRECUENTES AISLADAS EN CASOS CLÍNICOS.

Producción	<i>C. neoformans</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Rhodotorula sp</i>	<i>Saccharomyces sp</i>
Cápsula	+	-	-	-
Ureasa	+	-	+	-
Pseudohifas	-	+	-	-
Pigmento en medio Niger	+	-	-	-
Ascosporas	-	-	-	+
Basidiosporas	-	-	-	-
Pigmentación carotenolde	-	-	+	-

CÓDIGO DE TABLA: + POSITIVO, - NEGATIVO, (BONIFAZ, A.,⁴)

Existen diferencias en pruebas fisiológicas y térmicas entre otras especies del género *Cryptococcus*. En el cuadro 3 se resumen las propiedades más importantes.

TABLA 2.2.3. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Cryptococcus*

Propiedades	<i>C. neoformans</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. terreus</i>	<i>C. unigutulatus</i>
Ureasa	+	+	+	+	+
Crecimiento 37C	-*	-*	-*	-*	--*
Crecimiento 40 C	+	-	-	-	-
Utilización de KNO3	-	+	-	+	-
Virulencia en ratón	+	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+*	+
Sacarosa	+	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	+*	-
Galactosa	+	+*	+	+*	-*
Inositol	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+*	+	-*	+

CÓDIGO DE TABLA: + POSITIVO, - NEGATIVO, * VARIACIÓN DE CEPA.³⁵

Características como producción de ureasa, capacidad para producir pigmentos melanínicos y la presencia de su cápsula son rasgos presentes en el *C. neoformans*, que constituyen un factor de virulencia muy importante que maneja la levadura para establecerse en su huésped.²¹ Se debe mencionar, que en estudios recientes se han encontrado casos, donde el agente causal de la criptococosis, *C. neoformans* es ureasa negativa.²

2.3. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

El primer aislamiento en la naturaleza reportado para *C. neoformans* data de 1895, cuando Sanfelicé lo aisló de jugo de durazno. Posteriormente en 1901, fue obtenido a partir de leche por Klein.²⁵ No fue nuevamente aislado de una fuente saprófita, hasta que Emmons¹² en 1951 lo hizo de la tierra y de excretas de paloma en 1955.

De tal forma se estableció que el hábitat natural de *C. neoformans* var *neoformans* es el excremento de una gran variedad de aves como: palomas, pollos, pericos, gorriones, tordos, tórtolas, canarios y calandrias.¹ Aunque, el excremento de las aves, así como ellas mismas están colonizadas de *C. neoformans*, éstas no presentan la enfermedad. La razón de la alta frecuencia de *C. neoformans* var *neoformans* en el guano de las aves, no es clara, pero puede ser relacionada con la habilidad del hongo por asimilar xantina, urea, ácido úrico y creatinina, todo lo cual es abundante en las excretas.³¹

Aislamientos positivos de tierra, pueden ser obtenidos de áreas contaminadas por excrementos de aves; pero este medio ambiente es considerado hostil para el *C. neoformans* ya que condiciones anaerobias, altas temperaturas, disminución de la humedad, luz del sol directa, bajo pH y presencia de otros microorganismos como amibas y bacterias son determinantes para la supervivencia de *C. neoformans*.³²

Ellis y Pfeiffer en 1989 reportaron el primer aislamiento de la naturaleza de *C. neoformans* var *gattii* en árboles de *Eucalyptus camaldulensis*. Ellos mismos en 1992 establecieron una asociación entre *C. neoformans* var *gattii* y *Eucalyptus tereticornis*.^{9,10,11}

En México, se ha tratado de establecer su hábitat natural y para ello se han realizado una serie de estudios por Cervantes y cols., para determinar el foco de infección, particularmente para *C. neoformans var gattii*.

En cuanto a la distribución geográfica de la variedad *neoformans*, se sabe que proviene de climas templados, semejantes a los de U.S.A. (excluyendo sur de California y Hawai) Europa y Japón. En contraste a eso, una alta frecuencia (35 a 100%) de *C. neoformans var. gattii* fue aislada de regiones tropicales y subtropicales, semejantes al sur de California, Australia, Sureste de Asia, Brasil, Africa Central, Hawai y México.²⁰ Un estudio posterior realizado en la Ciudad de México por Cervantes, Salas y Segundo en 1988 y 1993, corroboraron lo antes mencionado al determinar que la variedad que prevaecía en casos clínicos era *C. neoformans var. gattii*.

Además de los estudios antes mencionados, Cervantes y Rendón³⁰ en 1986 realizaron un trabajo en el que muestrearon guano de paloma y gallina, corroborando lo reportado sobre el hábitat natural de *C. neoformans var neoformans*.

Como ya se ha mencionado anteriormente, *C. neoformans* se ha subdividido en dos variedades: var. *neoformans* (serotipos A y D) y var. *gattii* (serotipos B y C). Según Kwon-Chung los cuatro serotipos pueden causar la enfermedad en humanos y animales. En humanos se han reconocido dos principales grupos afectados por *C. neoformans*: A) Pacientes afectados con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, en donde casi todos los pacientes con este síndrome y con criptococosis son infectados con *C. neoformans var neoformans*. B) Individuos aparentemente normales, en donde es probable que existan defectos en las defensas del huésped que predisponen a la infección. Este segundo grupo se encuentra afectado principalmente por *C. neoformans var gattii*.^{23,24,28}

2.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la micosis se basa en la determinación de *C. neoformans* y / o en la demostración del antígeno criptocócico de algún líquido corporal, como líquido cefaloraquídeo (LCR), suero u orina. El resultado determinará la extensión de la infección y el tratamiento. El diagnóstico de laboratorio incluye:

2.4.1. Toma de muestra, ésta dependerá del tipo de criptococosis de que se trate, siendo la obtención del material clínico determinante, por lo que se puede contar con muestras como LCR, biopsias, expectoraciones, lavados bronquiales, pus, sangre u orina.

2.4.2. El procesamiento de las muestras, iniciará con un examen directo, mediante la utilización de hidróxido de potasio al 10 % y tinción de Gram, que es de poca utilidad, ya que no se pone en evidencia la cápsula de la levadura, pudiéndose confundir con otras.

2.4.3. Tinción negativa usando tinta China; para demostrar la presencia de material capsular. Una técnica modificada, desarrollada en el Hospital General de México por Bonifaz y colaboradores, muestran que usando una gota de fucsina básica, (de Ziehl-Neelsen) sobre el frotis de LCR fijado a la flama, y posteriormente teñido con tinta China como contraste; los resultados son buenos, observándose el cuerpo de la levadura de rojo a rosa y el halo correspondiente a su cápsula con un fondo negro.⁵

2.4.4. Cultivo. Para lo cual se utilizarán, desde medios tradicionales para el aislamiento de hongos; hasta el uso de medios específicos de aislamiento como el de niger. La identificación de la levadura, se debe complementar con pruebas que ya anteriormente se han mencionado, como asimilación de nitratos, producción de ureasa, asimilación de carbohidratos.⁴

La determinación de la variedad por diferentes métodos: Medio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB)¹⁶, Utilización de D-Prolina como única fuente de nitrógeno⁸ y la inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA (ácido etilendiamin-tetracético)²², deben de ser considerados como un importante dato clínico y además epidemiológico, para el conocimiento de la variedad. Por lo tanto, el hecho de llegar a determinar la variedad de que se trate, mediante el uso de las técnicas antes mencionadas, puede llegar a convertirse en un dato importante para el foco de infección en la naturaleza, en México. Todo esto en paralelo con el diagnóstico inmunológico, mediante el uso de la prueba de aglutinación en látex, como el método serológico más confiable para el diagnóstico de la criptococosis.

El fundamento de las tres pruebas de tipificación, para la obtención de la variedad de *C. neoformans*, es el siguiente:

2.4.5. Medio de Canavanina -glicina-azul de bromotimol

La prueba se basa en diferencias bioquímicas que presentan las dos variedades de *C. neoformans*. Contiene como única fuente de carbono y nitrógeno a la glicina; y un análogo de la arginina (canavanina) como inhibidor selectivo. Se adiciona azul de bromotimol, como indicador de pH.

Las cepas de *C. neoformans* variedad *gattii* pueden utilizar la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, además no son inhibidas por la canavanina, mientras que la variedad *neoformans* si lo es.

La alcalinidad indicada por un cambio en el pH, refleja el resultado de la producción de amonio, a su vez producto de la degradación de creatinina, que proviene de la utilización del análogo de la arginina, la canavanina.¹⁶

2.4.6. Inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA

Se basa en la reacción de hidrólisis de la urea, observada mediante el vire de un indicador (rojo de fenol), y un cambio de pH de neutro (amarillo) a alcalino (rojo magenta), como reacción positiva.

La utilización de EDTA, inhibe la actividad de la ureasa por cierto tiempo. En la variedad *neofomans* la actividad de la enzima es inhibida por menos tiempo que la variedad *gattii*; por lo que al utilizar un caldo RUH modificado, inoculado con cepas que provengan de un cultivo de 48 horas de desarrollo en YEPG adicionado de EDTA, se observará el vire del indicador a las cuatro horas de incubación para la variedad *neofomans*, a diferencia de la variedad *gattii* que lo presentará en un mayor tiempo.²²

2.4.7. Utilización de D-prolina como única fuente de nitrógeno

Se basa en el hecho de que *C. neofomans* var *gattii*, puede utilizar como única fuente de nitrógeno a la D-Prolina, a diferencia de la variedad *neofomans* que no lo hace.⁹

2.5. IMPACTO SOCIAL

Por la importancia epidemiológica que *C. neoformans* ha venido cobrando al ser causante de infecciones micóticas sistémicas en hombres y animales; el conocer su distribución en la naturaleza y el hábitat natural para ambas variedades es fundamental para avances clínicos en un futuro. En México, Cervantes y colaboradores en 1988 y 1993, realizaron estudios con muestras clínicas, donde encontraron que la variedad que prevalece en esta área geográfica, es *C. neoformans var gattii*; es por esto que el tener métodos de tipificación confiables para determinar la variedad de *C. neoformans* de que se trate, es importante. Los métodos utilizados para determinar la variedad de *C. neoformans* son: medio de CGB¹⁸, utilización de D-prolina como única fuente de nitrógeno⁸, e inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA.²² En este trabajo se utilizaron los tres métodos de tipificación, persiguiendo de este modo: conocer la variedad de las cepas y como consecuencia de ello, determinar el método más confiable, además de lograr así, datos de importancia epidemiológica para México y de esta manera determinar la variedad que prevalece. Si bien, lo antes mencionado podrá llevar a estudios de investigación más profundos, sobre la variedad de *C. neoformans* que nos aqueje, tomando en cuenta que *C. neoformans* se ha convertido en una de las micosis sistémicas más prevalentes.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

3.1. Ojetivo General

Tipificar cepas de *C. neoformans*, aisladas de casos clínicos.

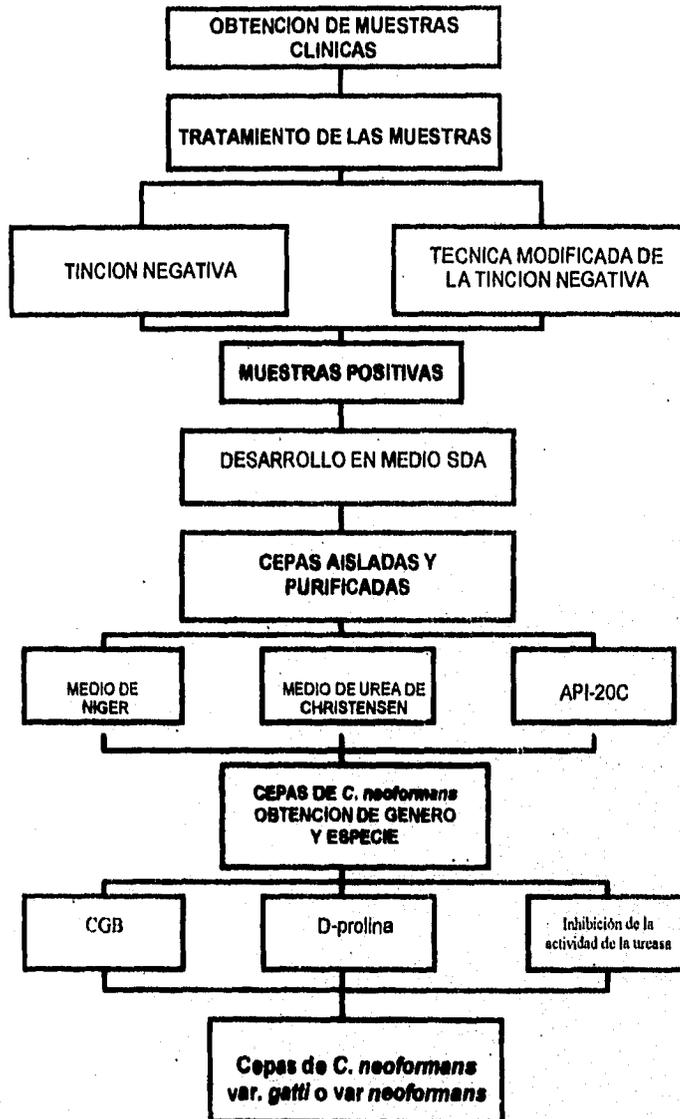
3.2. Objetivos Particulares

1. Identificar la variedad de las cepas de *C. neoformans* aisladas, mediante la utilización de tres métodos: medio de canavanina-glicina-azul de bromotímol (CGB), inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA y asimilación de D-prolina como única fuente de nitrógeno.
2. Determinar la variedad de *C. neoformans* que prevalece en los casos de criptococosis humana en México.
3. Determinar cuál de los métodos para la tipificación de *C. neoformans* es el más confiable , de fácil lectura y elaboración.

4. PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



* A algunas muestras se les corrió la prueba de patogenicidad en ratón.

4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se obtuvieron 40 muestras las cuales fueron obtenidas de diferentes hospitales ubicados en el Distrito Federal. Hospital General de México, Hospital Gea González de la Secretaría de Salubridad y el Centro Médico "La Raza", del Instituto Mexicano del Seguro Social. Todas las muestras procedían de pacientes residentes del Distrito Federal a excepción de una muestra que provenía del estado de Veracruz. Tabla 4.2.1.

TABLA 4.2.1. LUGAR DE PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.

Institución de salud	No de cepas donadas
Hospital General	33
Hospital Gea González	2
Centro Médico "La Raza"	5
TOTAL	40

Las muestras obtenidas fueron de pacientes hospitalizados. De los cuales se conto con la siguiente información:

TABLA 4.2.2 . CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS PROCESADAS.

Número de muestras	Tipo de muestras	Lugar de procedencia	Observaciones
22	LCR	Infectología	HIV +
15	LCR	Infectología	HIV -
1	Sangre	Hematología	Leucemia
1	Sangre	Neurología	HIV -
1	LCR	Neumología	HIV -
Total: 40			

4.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se realizó la observación microscópica de las muestras, para determinar la presencia de levaduras capsuladas; mediante la técnica de tinción negativa con tinta China. Las muestras fueron procesadas sin centrifugar, ya que se observó que no influía en la observación.

4.4. AISLAMIENTO

Después de la observación de las levaduras capsuladas, se procedió a la siembra de las muestras, de LCR en SDA, que se incubó a 37 °C durante un período de 24-48h. Un desarrollo en el medio de colonias convexas, mucoides, de color crema y con apariencia de leche condensada, eran presuntivas de colonias de *C. neoformans*.⁴

4.5. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE

Los cuarenta aislamientos, fueron sometidos a la tinción de Gram, para determinar la presencia de levaduras y la pureza de las mismos. Además de realizarse nuevamente tinción negativa para todas las cepas.

4.5.1. Desarrollo en medio de Niger

Después de haber obtenido los resultados de las pruebas microscópicas por tinción negativa y de Gram, las cepas se sembraron nuevamente para tener un cultivo de 48h de crecimiento y de este se realizó una siembra por estría sobre el medio de niger, donde un crecimiento de colonias con apariencia vidriosa y de color café es considerado un desarrollo positivo a *C. neoformans*. Ver apéndice.

4.5.2. Prueba de ureasa

Luego de la observación microscópica y macroscópica del medio de niger, se inició el desarrollo de pruebas de actividad bioquímica para la identificación de género y especie. Todas las cepas fueron sembradas sobre el medio de urea de Christensen e incubadas a 37 °C durante un periodo de 18-24h. Todo esto, a partir de cultivos recientes de 48 h de desarrollo en SDA. Ver apéndice.

4.5.3. Método estandarizado de identificación API-20C

Las cepas que cumplieron con las pruebas antes mencionadas, fueron sometidas a la tipificación estandarizada por el método API-20C para determinar, mediante la característica de asimilación de carbohidratos, la especie de *Cryptococcus* de que se trataba. Ver apéndice.

4.6. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE VARIEDAD

Siguiendo con la secuencia de tipificación, las cepas fueron sometidas a tres pruebas para determinar la variedad de *C. neoformans* que les correspondía. Las pruebas fueron:

4.6.1. Siembra en medio de CGB

Partiendo nuevamente de un cultivo reciente de 48h de desarrollo, se inoculó estriando la superficie del medio se incubó de 48-72 h a 37 °C y se realizó la lectura. Un viraje del indicador presente en el medio a azul, indica prueba positiva para la var. *gattii*, mientras que si permanece amarillo indica positivo para la var. *neoformans*. Ver apéndice.

4.6.2. Inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA

Para la realización de la prueba, se preparó un nuevo cultivo, bajo las mismas condiciones antes mencionadas y se implementó la prueba de inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA, como sigue: una asada en un cultivo en SDA, se inoculó en el medio de YEPG y se incubó a 37°C durante 48 h., se tomó asada del crecimiento de este medio y se sembró en YEPG adicionado de EDTA (YEPGE) incubándose bajo las mismas condiciones. Del YEPGE se preparó una suspensión al 1 de McFarland, en 2 ml. de solución salina fisiológica. La suspensión celular se pasó por el vortex y 1 ml de la suspensión se añadió a 1 ml. de caldo RUH. La mezcla se colocó en baño de agitación a 37 °C (40 oscilaciones/minuto). La lectura se realizó cada hora. El color rojo magenta se consideró una reacción positiva y el color amarillo una negativa. Ver apéndice.

4.6.3. Asimilación de D-Prolina como única fuente de nitrógeno

Partiendo de un cultivo reciente, se prepara el medio para la prueba como lo indica en el apéndice y se desarrolla la prueba. Se inocular sobre la superficie del medio, mediante una estría, que proviene de una suspensión en SSF al 1 de McFarland; para posteriormente incorporar los discos de D-prolina al 20%. Se incubó a 37 °C durante 48-72h. y se realiza la lectura. Se considera una reacción positiva, en caso de presentar desarrollo alrededor de los discos impregnados con D-prolina.

Se debe mencionar que durante el proceso de tipificación, se utilizaron los cuatro serotipos de Evans (serotipos A,B,C y D), como controles para una buena interpretación de los resultados.

5. RESULTADOS

RESULTADOS

De las 40 cepas procesadas se obtuvieron que 27 de ellas fueron tipificadas como *C. neoformans* var. *gattii*, lo que corresponde al 57.5 %; 10 cepas, que corresponde al 25 % fueron tipificadas como *C. neoformans* var. *neoformans* y el resto que corresponde al 17.5% (7 cepas) fueron tipificadas como *C. neoformans*, pero no pudo ser identificada la variedad.

TABLA 5.1. CEPAS DE *C. neoformans* vari. *gattii* y var. *neoformans* AISLADAS DE CASOS CLINICOS.

Identificación de género y especie	Variedad	Tipo de muestras	No de cepas (%)
<i>C. neoformans</i>	<i>gattii</i>	LCR/HIV-	12(30%)
<i>C. neoformans</i>	<i>gattii</i>	LCR/HIV+	9 (22.5%)
<i>C. neoformans</i>	<i>gattii</i>	Sangre/HIV -	1(2.5%)
<i>C. neoformans</i>	<i>gattii</i>	Sangre/Leucemia	1(2.5%)
<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	LCR/HIV+	7 (17.5%)
<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	LCR/ HIV-	3 (7.5%)
<i>C. neoformans</i>	IND	LCR/HIV+	6 (15%)
<i>C. neoformans</i>	IND	LCR/HIV-	1 (2.5%)
Total:			40 (100%)

IND: indeterminado.

TABLA 5.2. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS VARIEDADES DE *C. neoformans*

Variedad	CGB	Inhibición de la ureasa	Asimilación de D-Prolina	No de cepas (%)
<i>gattii</i>	+	-	+	23(57.5%)
<i>neoformans</i>	-	+	-	10(25%)
Total:				33 (82.5%) *

* La información del resto de las cepas se desglosa en el cuadro 7.

TABLA 5.3. RESULTADOS DE CEPAS NO IDENTIFICADAS PARA LOS TRES MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN.

Identificación	Variedad	CGB	Inhibición de la ureasa	Asimilación de D-Prolina	No de cepas (%)
<i>C. neoformans</i>	IND	+	+	-	1 (2.5%)
<i>C. neoformans</i>	IND	-	+	+	6(15%)
				Total:	7 (17.5%)
				Total gral:	40 (100%)

A continuación se presentan una serie de fotografías de los resultados observados durante el desarrollo del trabajo experimental.



FIGURA 5.3 Cultivo de *C. neoformans* en medio de Sabouraud; Se observa el desarrollo de colonias limitadas, mucoides, convexas, de color amarillento y de aspecto de leche condensada.

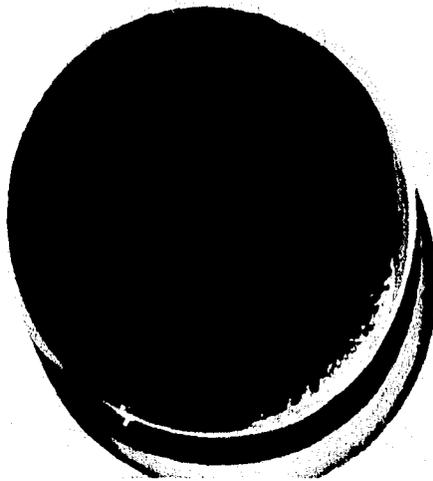


FIGURA 5.4 Colonias de *C. neoformans* en medio de semillas de Niger. Donde se muestran colonias de café oscuro, de aspecto vidrioso, con características de *C. neoformans*.

FALTA PAGINA

No. 30

31

32

6. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La metodología utilizada para el procesamiento de las muestras clínicas, fue sugerida por Staib (1963), ya que proporciona los elementos para el aislamiento y caracterización del género y especie de levaduras encontradas en las muestras clínicas estudiadas. De gran utilidad es el medio de Staib (niger), ya que permite de una manera clara, visualizar levaduras del género *Cryptococcus*, por la característica que tiene este de presentar una coloración café oscuro. El uso de sistemas estandarizados de tipificación, como lo es el sistema API-20C, confirmó la caracterización del género y especie.

Para la identificación de las variedades de las 40 cepas estudiadas se utilizaron los métodos descritos por Kwon-Chung, CGB (1982)¹⁸, D-prolina (1987)⁸ e inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA (1987)²², observándose que en 33 de las cepas, los resultados correlacionaron en forma exacta, sin embargo las 7 cepas restantes mostraron discordancia entre los tres sistemas, por lo que se consideraron no tipificables.

En nuestras manos, los tres sistemas para tipificar las variedades fueron efectivos en un 85%, siendo el CGB el método más confiable, práctico y fácil de efectuar, seguido por el de inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA y siendo el de asimilación de la D-prolina el más problemático por las dificultades de su lectura.

Un hallazgo importante durante el trabajo experimental, fue que al inicio del experimento cuando utilizando pruebas patrón, como la de urea y cepas patrón, las levaduras aisladas de los casos clínicos no reaccionaron en forma adecuada, por lo que fue necesario en los casos en lo que esto sucedió, pasar las cepas por modelo animal ratón con el fin de estimular su metabolismo, debido a que habían permanecido por un período prolongado de congelación.

La variedad prevalente en las muestras analizadas fue la variedad *gattii*, esto corrobora lo informado por Cervantes, Salas y Segundo (ISHAM 1994). En la tabla 9.2, se puede observar que 23 cepas que corresponden a un 57.5% resultaron ser *C. neoformans* var. *gatti* y 10 cepas un 25% fueron *C. neoformans* var. *neofomas*, haciendo un total de 33 cepas (82.5%). El resto, 7 cepas (17.5%) fueron consideradas intipificables, en 6 ellas se observa un comportamiento semejante, prueba de CGB positiva, inhibición de la actividad de la ureasa positiva y asimilación de D-prolina negativa (tabla 9.3). Por lo anteriormente mencionado con respecto a los métodos utilizados para la tipificación de la variedad, podemos llegar a decir que estas cepas estarían clasificadas dentro de la variedad *neofomas* y la cepa restante por el comportamiento presentado, ser variedad *gattii* (tabla 9.3). Pero estos no se podría asegurar, ya que por estar tratando con microorganismos biológicamente activos, la diversidad en su comportamiento también lo es. Es por esto que los métodos empleados para la tipificación de variedad de *C. neoformans*, quizá no sean lo suficientemente sensibles para englobar todas las características bioquímicas del metabolismo de el microorganismo en cuestion.

Por otra parte, el origen de las 39 muestras es de pacientes del D.F. y sólo 1 del estado de Veracruz; esto no nos permite sugerir distribución epidemiológica nacional. El hecho de que los pacientes en algunos de los casos fueran VIH positivos no modificó los porcentajes, esto está en contraposición de lo informado por otros autores(tabla 9.1)

Todo esto nos lleva a investigaciones futuras, donde estas sean guiadas a la búsqueda del hábitat natural de la variedad prevalente en México.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se determinó la variedad de las cepas de *C. neoformans*, mediante el uso de los tres métodos de tipificación: Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB), inhibición de la actividad de la ureasa por EDTA y asimilación de D-prolina como única fuente de nitrógeno; en un 82.5 % de las 40 cepas estudiadas.
2. Se identificó a *C. neoformans* variedad *gattii* como la que prevalece en los casos de criptococosis humana en México.
3. De los tres métodos utilizados para la tipificación de la variedad de *C. neoformans*, el más confiable, de fácil lectura y elaboración fue el uso del medio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol.
4. Se determinó que no existe relación entre la procedencia de las muestra y la variedad de *C. neoformans* obtenida.

8. APÉNDICE

APENDICE

8.1 Preparación de medios y reactivos

8.1.1 PREPARACIÓN. Agar dextrosa Sabouraud, (SDA)⁴.

Mezcla de peptonas	10 g.
Dextrosa	40 g.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

- Pesar 65g de agar comercial, agregar 1000 ml. de agua destilada.
- Disolver por calentamiento.
- Vaciar en cajas, tubos inclinados o como convenga.
- Se esteriliza en autoclave a 15 lb. de presión , durante 15 minutos.
- Vaciar en cajas Petri o en tubos inclinados.
- Dejar solidificar.

8.1.2 PREPARACIÓN. Medio de Niger^{28,32}.

Semilla de <i>Guizotia abyssinica</i> (Niger)	50g
Agar bacteriológico	15 g.
Cloranfenicol	50.0 mg.
Agua destilada	1000 ml.

- Macerar las semillas . Hervir por 25 minutos en 250 ml. de agua destilada.
- Filtrar a través de gasa o papel filtro.
- Adicionar 15 g. de agar bacteriológico. Aforar a un litro con agua destilada.
- Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión por 15 minutos.
- Enfriar a 50 °C aproximadamente y adicionar el cloranfenicol. Mezclar.
- Vaciar en cajas Petri.
- Dejar solidificar.

8.1.3. PREPARACIÓN. Medio de urea de Christensen ³².

- Disolver 29 g. de base urea en 100 ml. de agua destilada, se esteriliza por filtración (poro 0.45 μ m).
- Por otro lado, disolver 15 g. de agar purificado en 900 ml. de agua destilada, se esteriliza en autoclave a 15 lb. por 15 minutos.
- Esperar a que se enfríe a una temperatura entre 50 y 55 °C y adicionar los 100 ml. de urea filtrada, preparada anteriormente.
- Mezclar y distribuir en tubos e Inclinar.

8.1.4. METODO ESTANDARIZADO DE IDENTIFICACIÓN. API-20C.

- Colocar en baño María la ampolleta que contiene agar base nitrogenado, a una temperatura de 50-55 °C por 10 minutos, o hasta que se licue el medio.
- La tira de carbohidratos se acondiciona en su cámara húmeda.
- Inocular la ampolleta que contiene el agar base nitrogenado licuado, al 0.5 de MacFarland.
- Homogeneizar la ampolleta y llenar los pozos de los carbohidratos.
- Incubar a temperatura ambiente y realizar las lecturas a las 24, 48 y 72 hr.

8.1.5. PREPARACIÓN. MEDIO DE CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL¹⁸

Solución A. Glicina-L-Canavanina.

Glicina	10 g.
Fosfato de potasio	1g.
Sulfato de magnesio	1g.
Tiamina-HCl	1mg.
Sulfato de canavanina	30 mg.
Agua destilada	100 ml.

El pH final de la solución A se ajusta a 5.6. Para esterilizar la solución se filtra a través de una membrana de 0.45 μ m de diámetro.

Solución B. Solución indicador.

Azul de bromotimol	0.4 g.
Hidróxido de sodio 0.01N	64 ml.
Agua destilada	36 ml.

Disolver el azul de bromotimol en la solución de hidróxido de sodio, posteriormente adicionar el agua.

Para 100 ml de medio.

Agua destilada	800 ml.
Solución B	20 ml.
Agar purificado	20 g.

Esterilizar esta mezcla en autoclave; cuando el agar se encuentre a 50 °C aproximadamente, se agregan los 100 ml. de la solución A, preparada anteriormente; se mezclan y se sirven en cajas Petri.

8.1.6. PREPARACIÓN. Caldo Urea rápido (Broth-RUH)²²

Urea	4 g.
Extracto de levadura	0.02 g.
Rojo de fenol	2 mg.
Fosfato de potasio	0.273 g.
Fosfato de sodio	0.285 g.
Agua destilada	100 ml.

Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.45 µm. de diámetro. El pH final del caldo RUH es de 6.8.

8.1.7. PREPARACIÓN . Medio Glucosa-Peptona-Extracto de levadura (YEPG).²²

Extracto de levadura	3 g.
Peptona	5 g.
Glucosa	5 g.
Agar purificado	18 g.
Agua destilada	1000 ml.

Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión por 15 minutos.

8.1.8. PREPARACIÓN. Medio Glucosa-Peptona-Extracto de levadura-EDTA (YEPGE)²²

A la formulación de YEPG, se le adicionan 0.034 g/l de EDTA.

8.1.9. PREPARACIÓN. Medio Yeast-Carbon-Base (YCB) sin aminoácidos.⁸

Vitaminas

Biotina	2 µg.
Pantotenato de calcio	400 µg.
Inositol	2 µg.
Acido fólico	2 µg.
Niacina	400 µg.
Acido p-aminobenzóico	200 µg.
Hidróxido de piridoxina	400 µg.
Riboflavina	200 µg.
Hidróxido de tiamina	400 µg.

Sales

Acido bórico	500 µg.
Sulfato de cobre	40 µg.
Yoduro de potasio	100 µg.
Cloruro férrico	200 µg.
Sulfato de manganeso	400 µg.
Molibdato de sodio	200 µg.
Sulfato de zinc	400 µg.

Fosfato de sodio	
monobásico	1g.
Sulfato de magnesio	0.5g.
Cloruro de sodio	0.1g.
Cloruro de calcio	0.1g.
Agar purificado	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

El pH final del medio es 4.5.

- Disolver las vitaminas en 20 ml de agua destilada y esterilizar por filtración, usar una membrana de 0.45 μm de diámetro.
- Los demás compuestos de la formulación, se disuelven en 980 ml. de agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 lb. por 15 minutos.
- Esperar a que se enfríe el medio a 50 °C aproximadamente e incorporar los 20ml de la solución vitaminada, preparada anteriormente.
- Servir en cajas Petri.

8.1.10. Discos impregnados con D-Prolina.

- Preparar una solución de D-Prolina al 20 % en agua destilada .
- Cortar discos de papel filtro e impregnarlos con la solución anterior.
- Los discos impregnados se conservan en refrigeración a 4 °C.

8.2. TECNICAS DE TINCIÓN

8.2.1. TINCIÓN DE GRAM³²

- Colocar una gota de agua en una laminilla limpia y desengrasada.
- Suspende la muestra en el agua y esperar a que seque al aire.
- Fijar a la flama.
- Teñir por 1 minuto con cristal violeta.
- Lavar con agua.
- Agregar una gota de lugol.
- Lavar con agua.
- Decolorar con alcohol-acetona.
- Teñir con safranina por 1 minuto.
- Secar al aire.
- Observar al microscopio.

8.2.2. TINCIÓN NEGATIVA ³².

- Colocar una gota de tinta China en una laminilla limpia.
- Suspende la muestra en la tinta mediante una asa.
- Cubrir con un cubreobjetos.
- Observar al microscopio con el objetivo de 40X.

8.3 PRUEBA DE PATOGENICIDAD EN RATÓN ³¹

Se inoculan ratones jóvenes, aproximadamente de 3 semanas de edad, por vía intratecal.

Se prepara una suspensión de levaduras en solución salina fisiológica estéril, de un cultivo de 48h de crecimiento; se realiza un conteo celular y se realizan las diluciones pertinentes para obtener una concentración celular igual a 15 000 cel/ml.

Utilizando una jeringa para insulina, aspirar 0.02 ml de la suspensión celular. Anestesiarse el ratón con éter o cloroformo, colocar los dedos índice y pulgar de la mano izquierda sobre las orejas, para inmovilizar la cabeza y limpiar la piel con alcohol.

Un poco hacia la línea media a través del cráneo, la aguja se inserta lentamente rotando la jeringa como un pequeño taladro hasta que se perciba un pequeño estirón de la aguja. Empujar lentamente el émbolo de la jeringa para la inoculación.

La infección se manifiesta entre los 8 y 15 días siguientes a la inoculación; provocando en los ratones alteraciones en su comportamiento. La muerte instantánea o durante las primeras 48h, se debe a traumatismo causado por la inoculación.

9. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Bauwens L., Swinne D., DeVroey C., DeMeurichy W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. *Mykosen* 1984;28:200-5.
2. Bava A. J., Negróni R., Bianchi M. Criptococosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. *J. of Medical and Veterinary Mycology* 1993;31:87-89.
3. Bhattacharjee A. K., Bennett J. E. Capsular Polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Reviews of Infectious Diseases* 1984; 6:619-24.
4. Bonifaz A., 1990. *Micología Médica Básica*; Editorial Méndez Cervantes. México.
5. Bonifaz A. Garibay C. Estudio comparativo del diagnóstico micológico de la criptococosis meníngea. *Laborat-acta*. 1991;3:31-35.
6. Cherniak R., Morris L. C., Anderson B. C., and Meyer S. A. Facilitated Isolation, Purification, and Analysis of Glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991;59:59-64.
7. Congress of the International Society for Human and Animal Micology. Adelaide South Australia 1994. Cervantes, R.A.*; Carolina Segundo, C.; Salas, E. The varieties of *Cryptococcus neoformans* aistate from cases of meningitis in México City: Their relation with HIV. 1.FMVZ, 2. FES-Cuautitlán. UNAM, México City.

8. Dufait R., Velho R., De Vroey C., Rapid Identification of the Two Varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-Proline Assimilation 1987;30:483.
9. Ellis D.H., Pfeiffer T.J. Ecology , Life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet 1990;336:923-5.
10. Ellis D.H., Pfeiffer T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *gatti*. J. Clin Microbiol 1990;28:1642-4.
11. Ellis D.H., Pfeiffer T.J. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gatti* from *Eucalyptus tereticornis*. J. of Medical and Veter Mycology 1992;30:407-8.
12. Ellis D.H. 1994. Clinical Mycology. The human oportunistic mycoses. Editorial Pfeizer.
13. Emmons C.W. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. Public Health Rep 1960;75:362-4.
14. Evans E.E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. A serologic classification by means of the capsular and aglutination reaction. J. Inmunol. 1950;64:423-30.
15. Hernández G.R. 1988. Biotificación de cepas de *Filobasidiella (Cryptococcus) neoformans* y *gattii* aislados a partir de casos clínicos. Lic. Tesis. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
16. Koneman, Allen, Dowell, Sommers. 1989. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas de Color. Editorial Panamericana. Philadelphia.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

17. Kwon-Chung K.J., Bennett J.E., Rhodes J.C. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie van Leeuwenhoek* 1982;48:25-38.
18. Kwon-Chung K.J., Polachek I., Bennett J.E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotype A y D) and *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotypes B y C). *J. Clin Microbiol* 1982;15:535-7.
19. Kwon-Chung K.J., Polachek I., and Terry J. Melanin-Lacking Mutants of *Cryptococcus neoformans* and Their Virulence for Mice. *J. of Bacteriol* 1982;150:1414-21.
20. Kwon-Chung K.J., and Bennett J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984;120:123-40.
21. Kwon-Chung K.J., and Rhodes J. Encapsulation and Melanin Formation as Indicators of Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Inf and Immun* 1986;51:228-23.
22. Kwon-Chung K.J., Wickes L., Booth J.L., Vishniac H., and Bennett J.E. Urease Inhibition by EDTA in the Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Inf and Immun* 1987;55:1751-54.
23. Kwon-Chung K.J., and Bennett J.E. 1992. *Medical Mycology*. Editorial Lea & Febiger.
24. Kwon-Chung K. J., Pfeiffer T. Chang. Molecular biology of *C. neoformans* and therapy of cryptococcosis. *J. of Medical and Veter Mycol.* 1994; 32:407-415.

25. Levitz M. The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and Epidemiology of Cryptococcosis. *Reviews of Infect Diseases* 1991;13:1163-9.
26. Neilson J.B., Fromtling R.A., Bulmer GS. *Cryptococcus neoformans*: size range of infectious particles from aerosolized soil. *Infect Immun* 1977;17:634-8.
27. Perfect J.R., Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 1989;3:77-102.
28. Pfeiffer T.J. and Ellis D.H. Serotypes of environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. of Medical and Veteri Mycol.* 1993;31:401-404.
29. Polachek I., Platt Y., Aronovitch J. Catecholamines and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect And Immun* 1990;58:2919-2922.
30. Rendon R.C. 1986. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de paloma y gallina. Lic. Tesis. UNAM. Facultad de Estudios Profesionales Cuautitlán.
31. Rippon J.W. 1988. *Tratado de Micología Médica*. Philadelphia. 3er. edición. Editorial McGraw-Hill.
32. Ruiz A., Fromtling R.A., Bulmer G.S. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in the natural site. *Infect Immun* 1981;31:560-3.
33. Segundo Z.C. 1991. *Manual Teórico Práctico de Micología Médica para la carrera de Q.F.B. (prácticas y alternativas)*. Lic. Tesis U.N.A.M. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

34. Swinne D. Studie of *Cryptococcus neoformans* varieties. Mycosen
1984;27:137-41.

35. Wilson D.E., Bennett J.E., Bailey JW. Serologic grouping of *Cryptococcus*
neoformans. Proc Soc Exp Biol Med 1968;127:820-23.