

10524
54

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**IDENTIFICACION DE 25 CEPAS DE *Cryptococcus* sp
AISLADAS DE PACIENTES EN EL INSTITUTO DE
DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS
(I n D R E)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
CARMEN ROMERO MAYA

ASESORES:

QBP. CUDBERTO CONTRERAS PEREZ
DR. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ

Cuautilán Izcalli, Edo. de Mex.

2003
1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

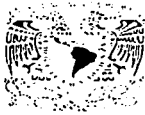


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



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

U. N. A. M.
 ASUNTO: VOTO APROBATORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Identificación de 25 cepas de Cryptococcus sp aisladas de
nacientes en el Instituto de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos (INDE).

que presenta la pasante: Carmon Romero Maya
 con número de cuenta: 94F0098-0 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Abril de 2002

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez

SECRETARIO M.V.Z. Mercedes Salgado Moreno

PRIMER SUPLENTE Dra. Susana E. Mendoza Elvira

SEGUNDO SUPLENTE C.A.R. Amparo Londoño Orozco

[Handwritten signatures and initials]

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

2

DEDICATORIAS

A ese ser maravilloso, que en sus tres
personas ha sido la luz de mi camino,
mi maestro y amigo...

DIOS

A mis padres...

Por su amor, su apoyo y su incansable
lucha por hacer de nosotros
seres mejores.

A mis hermanos...

Gaby, Lucy, Tín, Nufo, Lecho. Por compartir
conmigo su vida, su tiempo, su cariño y
por ser ejemplo de lucha.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis tres mosqueteros...

Carmen, Zaret y Francisco, quienes
han estado a mi lado y no me han
dejado desfallecer. Mis amigos.

A mis amigos de la facultad...

Juanita, Angeles, Lety, Diana, Ricardo.
Por compartir juntos toda una época.

A la Facultad...

Fuente del saber.
Mi segundo hogar.

A los profesores...

De quienes aprendí no sólo las bases
de mi carrera, sino también el cariño
y respeto hacia ella.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al personal del Laboratorio...

Paty, Claudia y Rubén.
Gracias por el gran apoyo, su interés,
y por la amistad que me brindaron.

Gracias por su tiempo, apoyo, dedicación
y paciencia, que me brindó.
Gracias por su enseñanza.
Mi asesor.
Q.B.P.Cudberto Contreras.

Por su apoyo en la realización
de esta tesis.
Mi asesor.

Dr. Tonatíuh Cruz.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A MITA...

Por no olvidarse de quién es,
por tener la fuerza y valor suficiente
para levantarse ante cada tropiezo
y porque a pesar del tiempo
hoy ve culminada una etapa más
en su camino, en su VIDA.

ADELANTE

SIEMPRE

ADELANTE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La vida es.....

La vida es una carrera,
no flores si la pista es áspera
y la meta distante.
Un día la alcanzarás.

La vida es un viaje,
no reclames si las tormentas
golpean el casco de la vela
y los vientos desgarran las velas.
Un día llegará a tu cielo.

La vida es crecimiento,
no encuentres fallas si la semilla
permanece sumergida en la tierra
obscura antes de que crezca y floree.
Un día tendrás cosecha.

La vida es simplemente eso... VIDA.

Joseph R. Sizoo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Este trabajo se realizó en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). En el Laboratorio de Micología del Departamento de Parásitos Oportunistas. Bajo la dirección del QBP. Cudberto Contreras Pérez. Jefe del laboratorio.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE GENERAL.

	Pág.
Abreviaturas	4
1. Resumen	6
2. Introducción	8
2.1 Sinonimia	
2.2 Definición	
2.3 Antecedentes	
2.4 Taxonomía	
2.5 Aspectos Epidemiológicos	9
2.5.1 Distribución Geográfica	
2.5.2 Fuente de Infección y Hábitat	
2.5.3 Vía de Entrada	
2.5.4 Sexo, Edad y Raza	
2.5.5 Ocupación	
2.5.6 Factores Predisponentes	
2.6 Patogenia	10
2.7 Formas Clínicas	11
2.7.1 Criptococosis Pulmonar	
2.7.2 Criptococosis del SNC	
2.7.3 Criptococosis Cutánea	
2.7.4 Criptococosis Ósea	
2.7.5 Criptococosis Diseminada	
2.8 Diagnóstico Diferencial	12
2.9 Agente Etiológico	13
2.10 Diagnóstico de Laboratorio	15
2.10.1 Tipo de Muestra	
2.10.2 Examen Microscópico Directo	
2.10.3 Cultivo	
2.10.4 Crecimiento a 37°C	
2.10.5 Pruebas Bioquímicas	
2.10.6 Pruebas Inmunológicas	
2.10.7 Histopatología	
2.11 Tratamiento	19
2.12 Pronóstico	19
3. Objetivos	21
4. Hipótesis	22
5. Justificación	23
6. Material y Metodología	24
7. Resultados	32
8. Discusión	40
9. Conclusiones	43
10. Apéndice	44
11. Glosario	52
12. Bibliografía	54

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE DE CUADROS, DIAGRAMAS Y TABLAS.

	Pág.
Cuadro No. 1	9
Clasificación Taxonómica de <i>C. neoformans</i> .	
Cuadro No. 2	16
Propiedades Bioquímicas de especies de <i>Cryptococcus</i> .	
Cuadro No. 3	17
Características Diferenciales de las variedades <i>neoformans</i> y <i>gattii</i> de <i>Cryptococcus neoformans</i> .	
Cuadro No.4	20
Características Bioquímicas de Asimilación y Fermentación de Carbohidratos de las especies de <i>Cryptococcus</i> .	
Tabla No. 1	25
Clave, Procedencia y Datos Generales de Aislamientos de <i>Cryptococcus sp.</i>	
Diagrama de Flujo No. 1	27
Diagrama de Flujo No. 2	31
Tabla No. 2	33
Resultados de las Características Morfológicas Microscópica y Colonial de 25 cepas de <i>Cryptococcus sp.</i>	
Tabla No. 3	34
Resultados de las Pruebas Bioquímicas de 25 cepas de <i>Cryptococcus sp.</i>	
Tabla No. 4	36
Resultados de las Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Variedad de <i>C. neoformans</i> .	
Tabla No. 5	38
Resultados de la Detección de Antígenos Metabólicos No Purificados de cepas de <i>Cryptococcus sp</i> con un Monoclonal Comercial (<i>Pastorex Cryptococcus</i>).	
Tabla No. 6	39
Resultados de la Determinación de Antígeno Capsular de <i>C. neoformans</i> en LCR de Pacientes con Diagnóstico Presuntivo de Criptococosis.	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ABREVIATURAS.

Ácido Desoxirribonucleico	DNA
Ácido Etilendiamino Tetraacético	EDTA
Agar Canavanina Glicina Azul de Bromotimol	CGA
Agar Canavanina Prolina Azul de Bromotimol	CPA
Agar Ciclohexamida Glicina Rojo de Fenol	GCR
Agar Dextrosa Sabouraud	SDA
Agar Glicina Azul de Bromotimol	GA
Agar Glucosa Peptona con EDTA	YEPGE
Agar Glucosa Peptona sin EDTA	YEPG
Agar Infusión Cerebro Corazón	BHI
Agar Prolina Azul de Bromotimol	PA
Celobiosa	CEL
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
3,4-dihidroxifenil alanina	DOPA
Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a una Enzima	ELISA
Galactosa	GAL
Galactoxilomanana	GalXM
Glucoronoxilomanana	GXM
Glucosa	GLU
Inositol	INO
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos	InDRE
Lactosa	LAC

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Líquido Cefalorraquídeo	LCR
Maltosa	MALT
Rafinosa	RAF
Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida	SIDA
Sistema Nervioso Central	SNC
Solución Salina Fisiológica estéril	SSFe
Superóxido Dismutasa	SOD
Trealosa	TRE
Variedad	var.
Xilosa	XIL

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN.

Se realizó el estudio taxonómico de 25 cepas de *Cryptococcus sp* aisladas de pacientes en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Las pruebas de laboratorio incluyeron el estudio de las propiedades morfológicas macro y microscópicas, el uso de pruebas bioquímicas con azúcares y aminoácidos (glucosa, maltosa, lactosa, rafinosa, galactosa, xilosa, trealosa, celobiosa, urea, glicina y prolina), el efecto de algunos inhibidores (ciclohexamida, L-canavanina y EDTA) así como el uso de un anticuerpo monoclonal comercial en una reacción de aglutinación con látex. Las pruebas incluyeron también el uso de dos cepas de referencia de *Cryptococcus neoformans* y en la prueba de aglutinación con látex se evaluaron reacciones cruzadas con especies de *Candida*, *Rhodotorula* y *Trichosporon sp*.

Los resultados revelaron que todas las cepas corresponden a la especie *Cryptococcus neoformans*. Las características más útiles y confiables fueron la presencia de cápsula (100%), la formación de pigmento en el medio de Staib (96%), asimilación de urea (96%), aglutinación con látex (92%).

Las pruebas bioquímicas con azúcares presentaron gran diversidad y no obstante que existe un patrón bioquímico definido para la especie *Cryptococcus neoformans*, estas pruebas presentaron un margen de error entre el 4 y el 72%, considerando que las pruebas de galactosa, xilosa y trealosa no son confiables para su identificación.

Las pruebas bioquímicas para diferenciar las dos variedades (glicina, prolina, ácido succínico e inhibición de la ureasa) delataron resultados muy ambiguos. Las pruebas más confiables fueron la hidrólisis de glicina e inhibición de la ureasa, donde 14 cepas tuvieron similar comportamiento y una cepa mostró diferencias. La comparación de las otras pruebas con estas, reveló para el ácido succínico una aceptación del 57% y para la prolina sin inhibidor del 36% y con inhibidor del 43%.

El uso por primera vez de un anticuerpo monoclonal comercial para la identificación de cepas reveló un porcentaje de confiabilidad bastante aceptable 92%, identificando 23 cepas de las 25 estudiadas. Cabe señalar que en este grupo de 25 cepas, se encontraron 2 mutantes una que no hidroliza la urea y otra que no produce pigmento en el medio de Staib, estas cepas finalmente se identificaron como *Cryptococcus neoformans*.

El uso del anticuerpo monoclonal de muestras clínicas reveló una excelente sensibilidad y especificidad. En 16 muestras de líquido cefalorraquídeo la prueba fue positiva en 4 casos, en los que el examen microscópico y cultivo también fueron positivos. En 9 casos de meningitis bacteriana la prueba fue negativa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados obtenidos cambian el panorama que se tiene de la criptococosis en México. La variedad predominante es *neoformans* y no *gattii*. En este trabajo no se encontró ninguna otra especie del género *Cryptococcus*. La asociación de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA no es tan alta como en otros países. La identificación de *Cryptococcus neoformans* y sus variedades implica un gran número de pruebas de laboratorio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Sinonimia.

Blastomycosis europea, torulosis, enfermedad de Busse-Buschke. (1,5,19,29)

2.2 Definición.

Es una micosis de curso subagudo o crónico, que afecta tanto al hombre como a los animales, causada por un hongo levaduriforme oportunista, *Cryptococcus neoformans*, se adquiere por vía respiratoria y es pulmonar en un 90%, afecta vísceras, músculo, piel, hueso y mucosas; tiene afinidad por el sistema nervioso central. (1, 19,21,29)

2.3 Antecedentes.

En 1894, Sanfelice, en Italia, aisló del jugo de durazno una levadura capsulada que la denominó *Sacharomyces neoformans*, con el que observó experimentalmente diversas lesiones en animales de laboratorio. En ese año en Alemania, Busse y Buschke, informaron el aislamiento del hongo a partir de una lesión sarcomatosa, observando la diseminación del microorganismo en hígado, pulmón, bazo, riñón y huesos; el agente etiológico lo clasificaron como *Sacharomyces hominis*. La primera denominación de *Cryptococcus*, se debe a Vullemin (1901), quien estudió la morfología y características de la cepa, comprobó que no tenía la capacidad de formar ascósporas, como lo hace el género *Sacharomyces* y por lo tanto la llamó *Cryptococcus hominis*. Posteriormente se le llamó *Torula histolytica* y *Torula neoformans*, por lo que se llamó a la enfermedad torulosis; finalmente fue reclasificada como *Cryptococcus neoformans*. Kwon-Chong (1975-1976) descubrió dos estados perfectos basidiosporados denominados *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora*. (5,19,29)

2.4 Taxonomía.

A *C. neoformans* se le ha encontrado dos estados perfectos o teleomórficos, que corresponden a basidiosporas y se denominan *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora*. (5) (cuadro No. 1)

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

Cuadro No. 1Clasificación Taxonómica de *C. neoformans*.

	Fase Asexuada	Fase Sexuada
Clase	Deuteromycetes	Basidiomycetes
Subclase	Blastomycetidae	Teleomycetidae
Orden	Cryptococales	Ustilaginales
Familia	Cryptococaceae	Ustilaginaceae
Género	<i>Cryptococcus</i>	<i>Filobasidiella</i> ó <i>Filobasidium</i>
Especie	<i>neoformans</i>	<i>neoformans</i>
Variedad	<i>neoformans</i> ó <i>gattii</i>	<i>neoformans</i> ó <i>gattii</i>

2.5 Aspectos Epidemiológicos.**2.5.1 Distribución Geográfica.**

La criptococosis es una enfermedad cosmopolita. (1,5,19)

2.5.2 Fuente de Infección y Hábitat.

Se encuentra en frutas cítricas como duraznos, peras, etc., vegetales en descomposición. Se ha aislado en leche, aunque los productos lácteos no tienen relación con infecciones en el ser humano, debido a que el microorganismo muere a 45°C durante el proceso de pasteurización. (5,19)

Su hábitat más importante es el guano de aves como pichones, palomas (*Columba livia*), gallinas, etc., obteniéndose hasta un 69% en los aislamientos, así como de suelo contaminado por el guano de las mismas; *C. neoformans* no es considerado como un hongo normal del suelo. Las palomas y diversas aves se convierten en hospederos o vectores indirectos que mantienen al microorganismo, pero no adquieren la enfermedad; esto se atribuye a su inmunidad natural y a la temperatura corporal que es de 40-42°C, a la cual *C. neoformans* se puede reproducir, pero es poco virulento. La levadura provoca una infección asintomática en el intestino, por lo que el guano sale infestado del hongo y se puede mantener en el medio ambiente, en especial si persiste cierta humedad, debido a que el guano es alcalino y tiene gran cantidad de compuestos nitrogenados, mantienen viable al microorganismo por mucho tiempo. (5,19,29)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2.5.3 Vía de Entrada.

A partir del suelo el hongo es diseminado a través del aire, llegando a tracto respiratorio, donde origina en el pulmón un foco primario. Puede ingresar también por vía oral, pero la lisozima salina y el pH del estómago lo inactivan. (5,19)

2.5.4 Sexo, Edad y Raza.

La criptococosis es más frecuente en el sexo masculino, que en el femenino; se presenta en todas las edades, pero especialmente entre los 30 y 50 años. No existe predilección por raza alguna. (1,5,19,21)

2.5.5 Ocupación.

Los trabajadores de establos, gallineros y palomares están más expuestos a *C. neoformans*; sin embargo la enfermedad es poco frecuente en ellos, ya que se requiere de factores predisponentes, en especial de una severa inmunodepresión. (5)

2.5.6 Factores Predisponentes.

El padecimiento se presenta en pacientes con enfermedades debilitantes como diabéticos, desnutridos, leucemias, linfomas, sarcomas, enfermedad de Hodgkin, SIDA, así como los que están bajo tratamiento con antibióticos, glucocorticoides o inmunosupresores, o bien con trasplante de órganos. (6,9,18,19,27)

2.6 Patogenia.

La criptococosis pulmonar se inicia por la inhalación de las levaduras que llegan hasta los alveólos, pasando las vías respiratorias, generando así el primocontacto pulmonar, que suele ser subclínico o asintomático, no genera respuesta inflamatoria. *C. neoformans*, para entrar al espacio alveolar y establecer la infección, produce formas viables vegetativas deshidratadas, células levaduriformes o basidiosporas con un diámetro de 2.5µm a 10µm. Al ser fagocitados por los leucocitos se rehidratan y adquieren el polisacárido capsular característico, para evitar ser digeridos. El componente glucoronoxilomanana (GXM) de la cápsula, interfiere en la fagocitosis por la formación del complejo antígeno-anticuerpo, previniendo la unión del anticuerpo a la cápsula, y disminuye además el número de receptores de superficie sobre los macrófagos. Al no existir una adecuada defensa celular, (células mononucleares, linfocitos, histiocitos, etc.), *C. neoformans* prolifera rápidamente diseminándose por vía linfática y hematógena con predilección del sistema nervioso central, en donde el líquido cefalorraquídeo es deficiente de un factor fungicida denominado factor anticriptocócico; las lesiones se desarrollan en las meninges y afectan los nervios craneales, tallo cerebral y cerebelo, provocando

una meningitis crónica, que a partir de ello se disemina a vísceras, piel y huesos. (5,19,29)

2.7 Formas Clínicas.

2.7.1 Criptococosis Pulmonar.

La criptococosis pulmonar cursa de manera asintomática (95%), sólo es detectada a través de un examen radiológico. La enfermedad se localiza de manera bilateral confinada al lóbulo superior. Su sintomatología es un cuadro gripal, acompañado de tos, temperatura y dolor pleural; cuando el proceso se intensifica, la fiebre es más constante, hay pérdida de peso, astenia, adinamia, tos con esputo mucoso. Pocas veces se observa la formación de criptococomas. (5,19,29)

2.7.2 Criptococosis del Sistema Nervioso Central.

Es la más frecuente, se origina a partir del foco pulmonar por diseminación hematológica. El neurotropismo de *C. neoformans* se atribuye a la falta del factor anticriptococócico en LCR, así como a la presencia de sustancias que estimulan el crecimiento como la asparagina y creatinina. La criptococosis en el SNC se presenta en 3 formas:

a)Meningitis (97%). Se manifiesta en forma crónica y gradual, con cefalea intensa, dolor de las órbitas oculares, fiebre constante pero no intensa (38°C), rigidez de la nuca y dolor. Conforme se vuelve crónica el paciente presenta vómito constante, vértigo, delirio, alucinación, irritabilidad, convulsiones, pérdida temporal de la memoria. Cuando el padecimiento progresa rápidamente, se manifiesta por pérdida de peso, astenia y adinamia, dando paso al coma y por lo regular el paciente muere por insuficiencia respiratoria. (5,29)

b)Meningoencefalitis (2%). Es rara, de curso agudo y fulminante, se presenta en pacientes con severa inmunodepresión, como pacientes sidosos o los que están sometidos a corticoterapia (trasplantes). (5)

c)Criptococomas (1%). Granulomas criptococales, conformados por masa fúngica que se desarrolla en el cerebro, en forma de abscesos; los pacientes presentan cefalea, vómito, náusea, convulsiones y por la compresión cerebral medular se generan diversas manifestaciones oftálmicas. Es grave su curso, migra fácilmente al coma, paro respiratorio y muerte. (5,29)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2.7.3 Criptococosis Cutánea.

a)Cutánea Primaria. Se inicia por la inoculación del hongo por vía cutánea, a través de una solución de continuidad, formándose un complejo primario, constituido por linfangitis y adenitis; dependiendo del estado inmune del paciente. Se manifiesta en forma de lesiones nódulo-granulomatosas en miembros superiores e inferiores. (5,19)

b)Cutánea Secundaria. Es más común, se origina por la diseminación hematógena o linfática de criptococosis pulmonar y/o meníngea. Se presenta en cara, cuello y miembros, con lesiones papulomatosas, acneiformes, abscesos, úlceras y lesiones verrucosas. Tiene mal pronóstico. (5,19)

2.7.4 Criptococosis Ósea.

Es frecuente, se origina de focos pulmonares o meníngeos, con predilección por huesos largos (fémur, tibia, esternón, etc.), huesos craneales y vértebras; afecta articulaciones, puede originar fístulas que salen a piel y drenan un material seropurulento mucóide, con intenso dolor óseo. (5,19)

2.7.5 Criptococosis Diseminada.

Se presenta en pacientes severamente inmunosuprimidos, en ellos invade prácticamente todos los órganos, como hígado, intestino, bazo, corazón, etc.; observándose lesiones granulomatosas. (5,19)

2.8 Diagnóstico Diferencial.

a)Criptococosis Pulmonar. Tuberculosis, neumonías por gramnegativos, coccidioidomicosis, histoplasmosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis, candidosis y carcinomas.

b)Criptococosis del SNC. Tuberculosis, neoplasias, meningitis bacteriana, enfermedad degenerativa del SNC.

c)Criptococosis Cutánea. Esporotricosis, acné, micobacteriosis atípica, tuberculosis, coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis.

d)Criptococosis Ósea. Osteomielitis, osteosarcomas, coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis.

e)Criptococosis. Diseminada. Tuberculosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis. (5,19)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.9 Agente Etiológico.

Existen varias especies del género *Cryptococcus* (*C. neoformans*, *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. terreus*, *C. uniguttulatus*), que son similares macroscópica y microscópicamente entre sí y que deben diferenciarse por pruebas fisiológicas y térmicas (cuadro No. 2); de las cuales, la considerada como patógeno es *C. neoformans*. Esta levadura se caracteriza por la presencia de una cápsula compuesta principalmente por polisacáridos de xilosa, manosa y ácido glucurónico; la cual es responsable de la virulencia. Presenta además diferentes determinantes antigénicos, los que han separado la especie en dos variedades, con dos serotipos cada una: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo A y D), *C. neoformans* var. *gattii* (serotipo B y C) (cuadro No. 3). Ambas variedades presentan una distribución y hábitat específico. La variedad *neoformans* ha sido aislada de excretas de palomas (*Columba livia*), frutas, productos lácteos, suelo, en menor frecuencia en otras excretas de aves y abono (2,7,9,18,19) mientras que la variedad *gattii* se ha aislado a partir de *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis*. (18,24)

Las dos variedades de *C. neoformans*, se encuentran distribuidas ampliamente en el mundo, en los Estados Unidos, el serotipo más común es el tipo A, mientras que el serotipo D se encuentra en la mayor parte de Europa y otras regiones de clima templado. El serotipo B en regiones tropicales y subtropicales (Sudeste de Asia) y el serotipo C predomina en el sur de California. (1,2,8,14,18)

2.9.1 Factores de virulencia.

La severidad de la enfermedad del huésped resulta de la combinación de diversos factores de virulencia, así como del estado de resistencia inmune. *C. neoformans* presenta un gran número de factores de virulencia, los cuales son: cápsula, productos criptococales, producción de melanina, producción de manitol, factores potenciales como superóxido dismutasa, proteasas, fosfolipasa B y lisofosfolipasa. El polisacárido capsular y los productos criptococales son probablemente los factores de virulencia dominantes. (7)

a) Cápsula.

C. neoformans tiene una cápsula compuesta principalmente de polisacáridos de elevado peso molecular, cuyo elemento principal es α -1,3-D-manopiranosica con residuos simples de β -D-glucuronopiranosil y β -D-xilopiranosil ligados; estos polisacáridos son referidos como glucuronoxilomanana (GXM). Esta evidencia indica que la cápsula es la clave de los factores de virulencia para *C. neoformans*; las especies mutantes sin cápsula son típicamente avirulentas. (7)

b) Productos Criptococales.

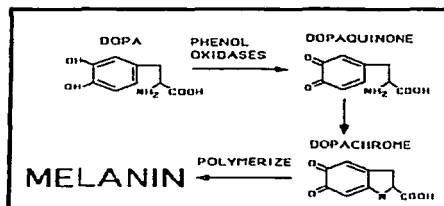
En la criptococosis diseminada, los niveles medibles de productos criptococales están presentes en los fluidos corporales de los pacientes, dichos productos son el

GXM (componente criptococal mayor), galactoxilomanana (GalXM) y manoproteínas (MP), ejerciendo efectos adversos sobre las defensas del huésped. Inhibiendo la migración de leucocitos hacia los sitios de inflamación aguda. (7)

c) Producción de melanina.

Una característica para diferenciar los aislamientos patógenos de los no patógenos de *C. neoformans*, así como de otras especies de *Cryptococcus*, es la habilidad del organismo para producir un pigmento café sobre el medio que contiene compuestos difenólicos (agar Staib). Este pigmento es un compuesto melánico con actividad de fenoloxidasas, y es considerado como un factor de virulencia. (7)

La síntesis de melanina es consumada por la conversión de cada dihidroxifenol; de tal modo que, el 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) se convierte en dopaquinona, reacción catalizada por fenoloxidasas; la dopaquinona a su vez se convierte en dopacirone y por autooxidación se produce la melanina; estos dos últimos pasos son espontáneos. (7)



Síntesis de melanina por *C. neoformans*.

La melanina depositada en la pared celular de *C. neoformans* inhibe la inducción de respuesta inmune.

d) Producción de manitol.

La producción de D-manitol contribuye a la supervivencia de *C. neoformans* en el huésped. Existen dos medios por los cuales la producción de manitol contribuye a la patogénesis:

- 1.- Las elevadas concentraciones de D-manitol en el SNC originan edema cerebral.
- 2.- El manitol como aporta radicales hidroxilo, protege a la levadura de daños oxidativos. (7)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

e) Superóxido Dismutasa.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) se produce en mayor cantidad cuando la levadura es crecida a 37°C, para compensar la posible disminución en la síntesis de melanina a esta temperatura. Se cree que participa en la aportación de radicales libres, sin embargo no se conoce cómo interviene en la virulencia de *C. neoformans*. (7)

f) Proteasas.

La proteasa digiere proteínas del plasma humano y también digiere caseína, sirviendo como un mecanismo de virulencia, ya que inicia una invasión de los tejidos del huésped. (7)

g) Fosfolipasas.

La fosfolipasa y la lisofosfolipasa producidas por *C. neoformans*, rompen membranas celulares del huésped y penetran hacia los tejidos; sin embargo no se ha establecido el papel que desempeñan en la virulencia de *C. neoformans*. (7)

2.10 Diagnóstico de Laboratorio.

2.10.1 Tipo de muestra.

Depende de la forma clínica de criptococosis, por lo que pueden ser muestras de expectoración, lavado bronquial. LCR, exudados, biopsias, suero, orina, cortes de tejido. (5,29)

2.10.2 Examen microscópico directo.

Debido a que se puede confundir con *Candida sp* o con otros hongos levaduriformes, se utiliza tinta china para observar la presencia de cápsula, como un halo transparente alrededor de la célula levaduriforme. La levadura llega a medir de 15 a 20 µ de diámetro, la cápsula mide hasta 3 veces el tamaño de la levadura. (5,29)

2.10.3 Cultivo.

Los medios de cultivo más útiles son agar dextrosa Sabouraud libre de ciclohexamida, extracto de levadura y agar BHI. El desarrollo se obtiene de 2 a 3 días a temperatura ambiente o a 37°C, forma colonias mucoides brillantes de color crema, limitadas. Se recomienda usar también el medio de Staib, en el cual las colonias presentan un color café característico, debido a que transforma el ácido cafeínico que contiene la semilla en un compuesto polimérico similar a la melanina. Es un medio selectivo para *C. neoformans*. (5,19)

Cuadro No. 2.

**PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE ESPECIES DE
Cryptococcus.**

Propiedad	<i>C. neoformans</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. gastricus</i>	<i>C. terreus</i>
Producción de ureasa	+	+	+	+	+
Crecimiento a 37°C	+	-	+/-	-	+/-
Crecimiento a 40°C	+	-	-	-	-
Utilización de KNO ₃	-	+	-	-	+
Virulencia en ratón	+	-	-	-	-
Prod. de pigmento en medio Niger	+	-	-	-	+/-

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuadro No. 3

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS VARIEDADES *neiformans* Y *gattii* DE *Cryptococcus neoformans*.

Característica	<i>C. neoformans</i> var. <i>neiformans</i>	<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>
Forma	ovoide	oblonga
Cultivo a 27°C	+	+/-
Cultivo a 30°C	+	+
Acido málico	-	+
Acido fumárico	-	+
Acido succínico	-	+
Creatinina	-	+
D-prolina	-	+
D-triptófano	-	+
Glicina	-	+
Poder patógeno (ratón)	fuerte	débil
Serotipos	A y D	B y C
Teleomorfos	Variedad <i>neiformans</i>	Variedad <i>bacillispora</i>
<i>Filobasidiella neoformans</i>		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.10.4 Crecimiento a 37°C.

La identificación de la especie de *C. neoformans*, tiene como base el crecimiento a 37°C; en cualquier medio de cultivo para su aislamiento. (17,22)

2.10.5 Pruebas Bioquímicas.

Zimograma.

El género *Cryptococcus* no fermenta ningún azúcar. Esta prueba establece la separación con otros géneros de levaduras de importancia médica (*Candida*). (cuadro No. 4) (3,5,13,16)

Auxonograma.

El perfil bioquímico de carbohidratos para *C. neoformans* y poder diferenciarla de las otras especies es: asimilación de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, trealosa, ramnosa, en ocasiones rafinosa, pero no lactosa. (cuadro No. 4) (5,19)

Hidroliza la urea, con la subsecuente producción de carbonato de amonio, utiliza el inositol, asimila la glicina (2,3,18,19)

2.10.6 Pruebas inmunológicas.

a) Aglutinación con partículas de látex. Se utiliza para determinar antígeno de *C. neoformans* en suero y LCR, agregando un anticuerpo anti-*Cryptococcus* unido a partículas de látex. Es sumamente segura para el diagnóstico de *Cryptococcus* (con sensibilidad del 90%). La prueba puede originar falsos positivos en una infección diseminada por *Trichosporon beigeli*. (4,6,13,15,34)

b) Inmunofluorescencia indirecta. Se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en suero. (1,5,29)

c) ELISA. Es la prueba más sensible para la búsqueda de anticuerpos.

d) Intradermorreacción. No tiene valor diagnóstico porque se han reportado cruces inmunológicos y sólo se utiliza con fines epidemiológicos. (13,26)

Las pruebas serológicas inmunodifusión, contrainmunolectroforesis y fijación de complemento, no se recomiendan debido a que en estas pruebas la sensibilidad para detectar anticuerpos anti-*Cryptococcus* es baja. (4,19)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.10.7 Histopatología.

En la piel se genera una reacción celular leve, encontrándose linfocitos, eosinófilos, histiocitos y células gigantes. En cerebro predominan lesiones líticas con cavidades y en pulmones la fibrosis. Los cortes de tejido deben colorearse por las técnicas de PAS y Gomori-Grocott. Se pueden confundir con cuerpos amiloides de la médula espinal. (5,19,30)

2.10.8 Susceptibilidad e Inoculación en animales.

El animal más susceptible es el ratón blanco; para originar la enfermedad se prepara una solución salina con 106 microorganismos por mililitro, y se inocula por vía intracerebral 0.02 a 0.04 ml, por vía intravenosa 0.2 ml, por vía intraperitoneal 0.5 ml; causando enfermedad generalizada letal en 8 a 30 días; sin embargo no se utiliza como procedimiento de diagnóstico. (5,19,21)

2.11 Tratamiento.

El antimicótico más activo en el tratamiento de la criptococosis es la anfotericina B, la cual debe ser administrada a una dosis diaria de 0.5 a 0.7 mg/Kg de peso. También se emplea 5-fluorocitosina a una dosis de 150 mg/Kg diarios por vía oral. Los azoles, ketoconazol e itraconazol a dosis de 400 y 200 mg/día respectivamente, son útiles en casos pulmonares o cutáneos puros; el fluconazol es un antimicótico alterno que se utiliza a la dosis de 50 a 150 mg/Kg diarios, que a diferencia de los otros dos atraviesa la barrera meníngea y provoca pocos efectos secundarios.

Los mejores resultados se obtienen mediante la combinación de anfotericina B con 5-fluorocitosina, o bien la combinación de anfotericina B con fluconazol.

El tiempo de terapia fluctúa entre 4 y 6 meses, con un alto índice de recidivas.

El éxito terapéutico depende de la rapidez con que se dé el diagnóstico y del estado del paciente. (1,5,19)

2.12 Pronóstico.

Las formas primarias pulmonar y cutánea pueden curar solas; hay formas cutáneas y óseas crónicas, lentamente progresivas; los casos meníngeos y en pacientes con SIDA son letales, con mortalidad de 75 a 100%. (5,29)

Cuadro No. 4

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE ASIMILACIÓN Y FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LAS ESPECIES DE *Cryptococcus*.

ESPECIE	ASIMILACIÓN										FERMENTACIÓN					
	GLU	MAL	SAC	LAC	GAL	CEL	INO	XIL	RAF	TRE	GLU	MAL	SAC	LAC	GAL	TRE
<i>C. neoformans</i>	+	+	+	-	+	v	+	+	v	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. uniguttulatus</i>	+	+	+	-	v	-	+	+	v	v	-	-	-	-	-	-
<i>C. albidus</i>	+	+	+	-	v	+	+	+	+	v	-	-	-	-	-	-
<i>C. laurentii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. terreus</i>	+	+	-	v	v	+	+	+	v	+	-	-	-	-	-	-

V: variable

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3. OBJETIVOS.

- a. Obtener cultivos monospóricos de las cepas para tener cultivos puros y evitar asimilación variable de substratos.
- b. Estudiar las propiedades bioquímicas de cepas de *Cryptococcus sp* aisladas de pacientes en el InDRE. Para determinar las pruebas más sensibles y confiables en la determinación de especie.
- c. Determinar las variedades de la especie de *Cryptococcus neoformans* en las cepas aisladas.
- d. Evaluar el anticuerpo monoclonal comercial (Pastorex *Cryptococcus*) para la identificación de *C. neoformans* a través de una reacción de aglutinación con látex. Valorar su especificidad con los géneros *Candida*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*.
- e. Determinación de antígeno de *C. neoformans* en líquido cefalorraquídeo (LCR) por aglutinación con látex y comparación con el examen microscópico tinta china, cultivo en pacientes con criptococosis y con infecciones bacterianas del sistema nervioso central.

4. HIPÓTESIS.

El uso de anticuerpos monoclonales comerciales en reacciones de aglutinación con látex, puede ser una prueba sensible y específica para la identificación de cepas *C. neoformans*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 5. JUSTIFICACIÓN.

C. neoformans es el segundo hongo oportunista que más afecta a los pacientes con SIDA. El hongo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (excretas de palomas (9.5%), frutas (9.5%), vegetales (4.2%) y *Eucalyptus camaldulensis*). En la ciudad de México han proliferado gran cantidad de palomas y también se ha incrementado la población con factores oportunistas (diabetes mellitus, cáncer, SIDA), los que condicionan un mayor riesgo de infección por este hongo.

Esta investigación contribuirá a obtener un mayor conocimiento sobre la variedad que predomina de *C. neoformans* en México, así como también permitirá establecer medidas para el control de las fuentes de transmisión.

Existen también problemas en el diagnóstico e identificación del hongo por lo que hemos considerado que el uso de anticuerpos monoclonales comerciales, puede solucionar en gran parte este problema. Estos reactivos tienen algunas desventajas (tiempo limitado de caducidad, elevado costo), es por ello que deben aprovecharse al máximo. En éste trabajo los anticuerpos monoclonales, además de usarlos en el diagnóstico y evaluar su especificidad, los usaremos para la identificación de cepas de *Cryptococcus sp.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1.- Material Biológico.

6.1.1 Cepas:

- a) 2 cepas de referencia de *C. neoformans*, var *neoformans*.
National Institute of Health, Bethesda, MA. USA (5601); Duke University, Durham, NC. USA (5602).
- b) 25 cepas de *Cryptococcus sp.*, aisladas de muestras de: LCR (22), sangre(1), piel (2), de pacientes con criptococosis. (tabla No. 1)
- c) 12 cepas de *Trichosporon sp.*
- d) 7 cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. kefír*, *C. zeylanoides*)
- e) 4 cepas de *Rhodotorula* (*R. rubra*, *R. glutinis*, *R. araucariae*, *R. graminis*).

6.1.2 Muestras clínicas.

- a) 16 muestras de LCR de pacientes con diagnóstico presuntivo de criptococosis. Proporcionadas por el InDRE.
- b) 9 muestras de LCR de pacientes con diagnóstico de meningitis bacteriana. Proporcionadas por el hospital La Raza.

6. 2.-Obtención de cultivos monospóricos.

- 6.2.1 Sembrar en un tubo de medio SDA (inclinado) la cepa de *Cryptococcus sp* e incubar a 30°C por 48 horas.
- 6.2.2 Hacer una suspensión de la levadura en SSFe ó agua estéril, hasta lograr una similitud con el tubo 0.5 de Mc Farland.
- 6.2.3 Tomar con el asa un inóculo de la suspensión de la levadura y estriar en placa con medio SDA.
- 6.2.4 Observar al microscopio estereoscópico la placa estriada con la suspensión de la levadura, para localizar aquella célula que se encuentra aislada de las demás.
- 6.2.5 Cortar el trozo de agar con una lanzeta estéril sujeta a un mango de bisturí, realizando cuatro cortes (cuadrado).
- 6.2.6 Con mucho cuidado, levantar el trozo de agar y depositarlo en un tubo de medio SDA (inclinado), incubar a 30°C durante 48 horas.
- 6.2.7 Observar el tubo, si hay más de dos colonias descartarlo y repetir el procedimiento, hasta lograr obtener una colonia. (8) (diagrama de flujo No. 1)

6.3.-Identificación de la especie de *Cryptococcus sp.*

6.3.1 Examen microscópico con tinta china.

-Sobre un portaobjetos limpio, agregar una gota de tinta china (diluida 1:3) en solución salina 0.85% o agua.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla No. 1

CLAVE, PROCEDENCIA Y DATOS GENERALES DE AISLAMIENTOS DE *Cryptococcus* sp.

Cepa	Fecha	Paciente	Edad	Género	Raza	Lugar de Origen	Muestra Clínica	Factores Predisponentes
5601		Cepa de Referencia National Institute of Helad, Betesda, MA. USA.						
5602		Cepa de Referencia Duke University, Durham, N.C. USA						
5604	Jun-61	RHA	38	M	M	D.F.	LCR	-
5605	Feb-62	RNP	47	M	M	D.F.	LCR	-
5606	Jul-65	EVH	40	M	M	D.F.	LCR	-
5607	Oct-65	JCHS	52	M	M	D.F.	LCR	-
5608	Oct-67	DGG	41	M	M	D.F.	LCR	-
5609	Sep-66	MSS	42	F	M	D.F.	PIEL	-
5611	Nov-70	LMF	33	M	M	D.F.	LCR	-
5613	Ago-73	JPS	47	M	M	D.F.	LCR	-
5615	Sep-78	GMM	59	M	M	D.F.	PIEL	-
5616	Nov-80	RLM	59	M	M	D.F.	LCR	-
5617	Nov-80	NSS	32	F	M	D.F.	LCR	-
5618	Nov-80	GKK	57	M	M	D.F.	LCR	-
5619	Oct-82	AMG	35	M	M	D.F.	LCR	-
5620	Ene-86	IAM	11	F	M	D.F.	LCR	-
5621	Jun-87	PNH	47	M	M	Michoacán	LCR	-
5622	May-88	IMC	43	M	M	D.F.	LCR	-
5623	Jun-90	ACO	34	M	M	D.F.	LCR	HIV+
5624	Ago-90	PTC	46	M	M	D.F.	LCR	-
5625	Sep-91	JBB	49	M	M	D.F.	Sangre	-
5626	Feb-92	JHB	53	M	M	D.F.	LCR	HIV+
5627	Mar-92	ARA	37	M	M	D.F.	LCR	HIV+
5628	Abr-92	FSP	29	M	M	D.F.	LCR	-
5629	Mar-97	FRS	58	M	M	D.F.	LCR	-
5630	Jun-98	JBM	30	M	M	D.F.	LCR	-
5631	Mar-99	LRR	28	M	M	D.F.	LCR	-

Género: F:Femenino M:Masculino
 Muestra Clínica: LCR: Líquido cefalorraquídeo
 Raza: M: Mestizo
 Lugar de Origen: D.F.: Distrito Federal

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

-Con el asa estéril suspender un pequeño inóculo de la cepa correspondiente en la tinta china y hacer una suspensión.

-Cubrir la muestra con un cubreobjetos limpio.

-Observar al microscopio (10X o 40X) la presencia de levaduras capsuladas. (13)

6.3.2 Cultivo en agar Staib.

-Con el asa estéril, tomar un inóculo de la cepa y sembrarla sobre el agar Staib (agar Niger) mediante la técnica de estría cruzada. Incubar a 30°C durante tres a cinco días.

-Observar la producción de pigmento café de las colonias en el medio, así como su aspecto. (3,10,13,32)

6.3.3 Asimilación de la urea.

-Con el asa estéril tomar un inóculo de la cepa desarrollada en el medio ASD, suspenderlo en 5 ml de medio caldo de urea. Incubar 24 horas a 37°C, si no hay reacción incubar por 3 días más.

-Observar el cambio de color en el medio, de naranja claro a púrpura. (Prueba positiva). (3,13,16,25)

6.3.4 Asimilación de carbohidratos.

-Con el asa estéril tomar un inóculo de la cepa crecida en el medio ASD y suspender en 2 ml de medio base YNB de cada uno de los carbohidratos (galactosa, maltosa, trealosa, rafinosa, celobiosa, glucosa y xilosa). (ver apéndice)

-Incubar a 32°C durante 5 días.

-Observar el vire del indicador en el medio, de color naranja claro a amarillo. (prueba positiva). (3,13,25) (diagrama de flujo No.1)

6.4.-Identificación de la variedad de *Cryptococcus neoformans*.

6.4.1 Asimilación de aminoácidos e inhibición del crecimiento.

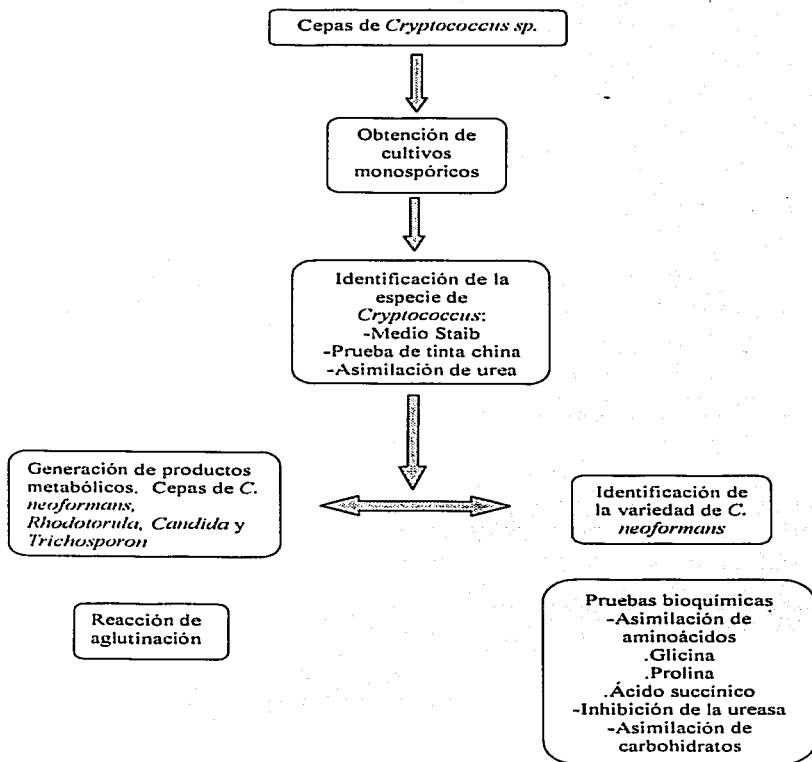
-Tomar inóculos de la cepa desarrollada en el medio SDA, en condiciones estériles y estriarlos sobre los medios CGA, CPA (medios que contienen el inhibidor L-canavanina) y GCR (contiene el inhibidor ciclohexamida); así como en los medios sin inhibidor GA y PA.

-Incubar los medios a 30°C durante 7 días.

-Observar el cambio de color en cada uno de los medios CGA, CPA, GA y PA de amarillo a azul cobalto y el medio GCR de amarillo a rojo. Sólo la var. *gattii* asimila glicina y prolina y su crecimiento no se afecta por ninguno de los dos inhibidores empleados. (17,19,31)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIAGRAMA DE FLUJO No. 1.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.4.2 Asimilación de ácido succínico.

-Con el asa estéril tomar un inóculo de la cepa crecida en SDA y suspenderlo en 2.5 ml de medio ácido succínico.

-Incubar el medio a 30°C durante 2 a 5 días.

-Observar el cambio de color del medio de púrpura a amarillo. Este substrato sólo es asimilado por la var. *gattii*. (3,13,25)

6.4.3 Inhibición de la ureasa por EDTA.

-Con el asa estéril tomar inóculo de la cepa desarrollada en SDA y sembrarla por estría en los medios YEPGE y YEPG.

-Incubar a 30°C por 48 horas.

-Una vez desarrollada la cepa en los medios, tomar un inóculo y suspenderlo en 5 ml de SSFe o agua estéril, hasta tener similitud con el tubo 0.5 de Mc Farland.

-De la suspensión tomar 1 ml y agregarlo a un tubo que contiene 3 ml del medio caldo de urea.

-Agitar el tubo en un vórtex.

-Colocar el tubo del medio con la levadura en un baño maría a 37°C durante 4 horas.

-Observar cambio de color en el medio, de naranja claro a rojo.

La enzima ureasa de la var. *gattii* es inhibida por el EDTA presente en el medio YEPGE, por lo que no es capaz de asimilar la urea. (20) (diagrama de flujo No.1)

6.5.-Identificación de antígenos metabólicos no purificados de cepas de *Cryptococcus sp.*, de *Trichosporon sp.*, especies de *Rhodotorula* y especies de *Candida*, con el monoclonal comercial (Pastorex anti-*Cryptococcus*, Sanofi Diagnostics Pasteur 61707).

6.5.1 Preparación de antígenos metabólicos no purificados.

-Con el asa estéril tomar un inóculo de la cepa y suspenderlo en medio Sabouraud líquido (25 ml).

-Incubar los tubos a 30°C durante 15 días.

-Centrifugar los tubos (2500 rpm) y retirar el sobrenadante.

-Filtrar el sobrenadante con membranas de 0.45 μ m de diámetro.

-Realizar con el filtrado la prueba de aglutinación con partículas de látex.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.5.2 Aglutinación con partículas de látex.

Pastorex Anti-*Cryptococcus* es una prueba cualitativa y semicuantitativa que mediante una técnica de aglutinación, permite detectar los polisacáridos capsulares de *Cryptococcus neoformans* (glucoronoxilomanano) en los líquidos biológicos (suero, LCR, LBA y orina).

Esta prueba utiliza partículas de látex recubiertas con un anticuerpo monoclonal antiglicuronoxilomanano (GXM), principal componente de la cápsula de *C. neoformans*.

a) Tratamiento de la muestra.

-Agregar 120 µl de la muestra a probar en un tubo con tapón hermético y añadir 20 µl de pronasa.

-Homogenizar mezclando enérgicamente y calentar en baño maría a 56°C durante 30 minutos.

-Retirar el tubo del baño maría y añadir una gota de solución de parada (inhibidor enzimático).

-Homogenizar.

b) Reacción de aglutinación.

-Depositar 40 µl de muestra tratada en un círculo de la tarjeta de aglutinación.

-Depositar al lado 10 µl de látex *Cryptococcus*.

-Mezclar con un aplicador.

-Colocar la tarjeta de aglutinación sobre el agitador durante 10 minutos (160rpm), a temperatura ambiente o en una cámara húmeda.

c) Lectura e interpretación.

Una reacción positiva se manifiesta por una aglutinación de las partículas de látex.

En el caso de muestras muy positivas, la aglutinación se refuerza en diluciones importantes. (diagrama de flujo No. 1)

6.6.-Detección de antígeno capsular de *C. neoformans* en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Mediante pruebas de aglutinación con un monoclonal comercial (Pastorex Anti-*Cryptococcus*).

6.6.1 Preparación de la muestra.

- Cada una de las muestras de LCR se centrifugan a 2500 rpm y se retira el sobrenadante.

- El sedimento se utiliza para el examen microscópico directo con tinta china y el cultivo.

-Al sobrenadante se le realiza la prueba de aglutinación con partículas de látex, anteriormente descrita. (ver procedimiento número 5.2)

6.6.2 Examen directo con tinta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

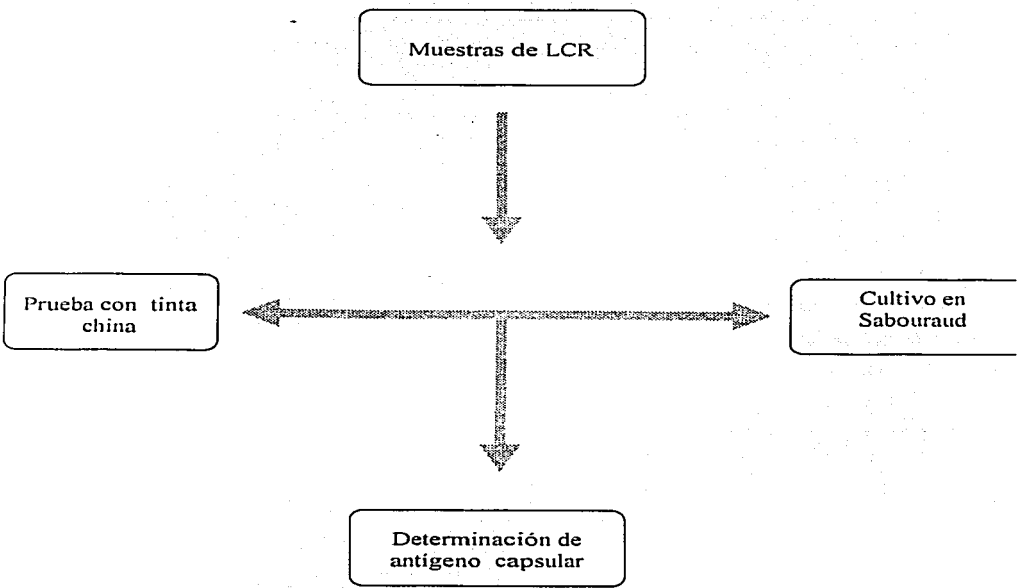
- Sobre un portaobjetos limpio, agregar una gota de tinta china diluida (1:3) en solución salina al 85% o agua.
- Con una pipeta Pasteur tomar una gota del sedimento y suspenderla en la tinta china.
- Cubrir la muestra con un cubreobjetos limpio.
- Observar al microscopio (10X o 40X) la presencia de levaduras capsuladas. (13) (diagrama de flujo No. 2)

6.6.3 Cultivo en agar Sabouraud.

- Tomar con una pipeta Pasteur una gota del sedimento y depositarla en el medio agar Sabouraud, estriar la placa.
- Incubar durante dos días a 30°C.
- Observar las características del crecimiento de la levadura (morfología colonial y microscópica). (13,25) (diagrama de flujo No. 2)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIAGRAMA DE FLUJO No. 2.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

7. RESULTADOS.

El examen microscópico directo con tinta china permitió la identificación de las 25 cepas en estudio, ubicándolas a todas en el género *Cryptococcus*, por la formación de cápsula con un tamaño variable. En el medio de Staib las cepas formaron 3 tipos de colonias: 13 (52%) cepas desarrollaron colonias con pigmento café oscuro, forma esférica, convexas, de bordes continuos y textura cremosa. 11 (44%) cepas desarrollaron colonias con pigmento verde, al principio aisladas pero después produjeron abundante polisacárido, exhibiendo una superficie mucóide en todo el crecimiento. Una sola cepa (5616) no desarrolló pigmento, permaneciendo las colonias de color crema, no mucóides y de aspecto cremoso. (tabla No. 2)

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, nos muestran 24 (96%) cepas que asimilan la urea y sólo una cepa (5616) no hidroliza la urea. Las pruebas de asimilación de azúcares realizada concuerda en gran parte con el patrón bioquímico mencionado en el cuadro No. 2. Ninguna cepa utiliza la lactosa, mientras que la glucosa es asimilada por todas. La mayoría de las cepas hidrolizan la maltosa (24 (96%)), galactosa (23(85%)) y xilosa (20(80%)); la rafinosa (15(56%)), trealosa (7(25%)) y celobiosa (2(15%)) son asimiladas por un menor número de cepas. (tabla No. 3)

La combinación de los resultados de la morfología macro y microscópica, así como de las pruebas bioquímicas, ubican a 24 de las cepas estudiadas en la especie *Cryptococcus neoformans*. Sólo el patrón bioquímico de la cepa 5616, no correlaciona con las especies de importancia médica; sin embargo los resultados obtenidos con tarjetas de un sistema automatizado VITEK que utiliza 26 sustratos y 4 testigos. (ver apéndice) realizadas en el laboratorio (Gal (+), Xil (+), Lac (-), Glu (+), Cel (+), Tre (+), Raf (-), Mal (+), Urea (-)), permitió ubicar a esta cepa como *Cryptococcus neoformans*.

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas para diferenciar las variedades de *C. neoformans*, revelaron un comportamiento variable. 11 (44%) cepas presentaron desarrollo en el medio CGA, originando un vire en el indicador (azul de bromotimol) de un color amarillo a azul cobalto, característica descrita para la variedad *gattii*; mientras que 14 (56%) cepas no se desarrollaron en el medio, ni viraron el indicador, característica que corresponde a la variedad *neoformans*. En el medio GA sin inhibidor, 12 (48%) cepas asimilan la glicina, originando un color azul cobalto en el medio, las cepas restantes (13 (52%)), no desarrollaron, permaneciendo el medio de color amarillo (*var. neoformans*). (tabla No. 4)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla No. 2.

RESULTADOS DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
MICROSCÓPICAS Y COLONIAL DE 25 CEPAS DE *Cryptococcus*
sp.

CEPA	CAPSULA (ASD)	PIGMENTO EN AGAR STAIB	BORDES	SUPERFICIE	ASPECTO
5601	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5602	+	crema	continuos	Ligeramente convexa	No mucoide
5604	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5605	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5606	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5607	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5608	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5609	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5611	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5613	+	crema	continuos	Ligeramente convexa	No mucoide
5615	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5616	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5617	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5618	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5619	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5620	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5621	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5622	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5623	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5624	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5625	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5626	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5627	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5628	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5629	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide
5630	+	café	continuos	Ligeramente convexa	cremosa
5631	+	verde	continuos	Ligeramente convexa	mucoide

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla No. 3.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE 25 CEPAS
DE *Cryptococcus sp.*

CEPA	UREA	LAC	MALT	GAL	XIL	GLU	TRE	CEL	RAF
5601	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5602	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5604	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5605	+	-	+	+	+	+	-	-	-
5606	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5607	+	-	+	+	+	+	+	-	-
5608	+	-	+	+	-	+	-	-	+
5609	+	-	+	+	-	+	-	-	-
5611	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5613	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5615	+	-	+	+	-	+	-	-	-
5616	-	-	+	+	+	+	+	+	-
5617	+	-	+	+	+	+	+	-	+
5618	+	-	+	+	+	+	-	-	-
5619	+	-	+	-	+	+	-	-	-
5620	+	-	+	-	-	+	+	-	+
5621	+	-	+	+	-	+	-	-	+
5622	+	-	-	+	+	+	+	-	+
5623	+	-	+	+	+	+	+	-	-
5624	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5625	+	-	+	-	+	+	+	-	-
5626	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5627	+	-	+	+	+	+	-	-	+
5628	+	-	+	+	+	+	-	-	-
5629	+	-	+	-	+	+	-	+	-
5630	+	-	+	-	+	+	-	-	-
5631	+	-	+	+	+	+	-	-	+

En el medio PA con y sin inhibidor se obtuvieron resultados variables. En el medio con inhibidor (CPA) 19 (72%) cepas asimilaron el aminoácido (prolina), originando vire del indicador de amarillo a azul cobalto (*var. gattii*) y sólo 6 cepas no desarrollaron, ni viraron el indicador del medio (*var. neoformans*). En el medio sin inhibidor (PA), 20 (80%) cepas asimilaron la prolina, virando el color del medio a azul cobalto y 5 (20%) cepas no presentaron crecimiento en el medio, ni viraron el indicador (*var. neoformans*). (tabla No. 4)

En el medio GCR, 21 (84%) cepas asimilaron la glicina, virando el color del medio de amarillo a rojo (*var. gattii*) y sólo 4 (16%) cepas no asimilaron la glicina del medio, permaneciendo este de color amarillo (*var. neoformans*). La asimilación de ácido succínico, reveló que 17 (68%) cepas lo utilizan como fuente de carbono, originando vire del indicador de púrpura claro a color amarillo, característica de la variedad *gattii*; mientras que las 8 (32%) cepas restantes no desarrollaron en el medio, permaneciendo este de color púrpura, característica descrita para la variedad *neoformans* (tabla No. 4). Es importante señalar que la cepa 5616, tanto en los medios de asimilación de aminoácidos (CGA, GA, CPA, PA) como en el medio de ácido succínico, presenta buen desarrollo y origina cambio de color en los medios (amarillo a azul cobalto y púrpura claro a amarillo respectivamente). Estos resultados ubican a esta cepa en la variedad *gattii*.

Los resultados de la actividad de la ureasa y su inhibición en el medio YEPGE con EDTA presentaron variaciones importantes, 15 (60%) cepas asimilaron la urea del medio, virando el color de naranja a rojo, característica de la variedad *neoformans*, mientras que 10 (40%) cepas fueron inhibidas por el EDTA a la concentración de 0.034 g/l, sin originar cambio de color en el medio (*var. gattii*). En el medio YEPG sin EDTA, 23 (92%) cepas asimilaron la urea y sólo 2 (8%) no lo hicieron, permaneciendo la prueba negativa hasta la última lectura (5 días). (tabla No. 4)

El uso de un monoclonal comercial (Pastorex Anti-*Cryptococcus*) en contra del polisacárido capsular de *C. neoformans*, fue usada por primera vez para la identificación de cepas. La reacción de aglutinación fue positiva en 23 (92%) cepas, mientras que 2 (8%) cepas (5609 y 5619) no presentaron reacción alguna. En 12 cepas de *Tichosporon sp.*, 3 (25%) dieron reacción de aglutinación positiva y 9 dieron reacción negativa. En 7 cepas de diferentes especies del género *Candida* y 4 cepas del género *Rhodotorula*, la reacción de aglutinación fue negativa. (tabla No. 5)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla No. 4

**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE
VARIEDAD DE *C. neoformans*.**

CEPA	CGA	CPA	GCR	GA	PA	AC.SUC	YEPGE	YEPG	VARIEDAD
5601	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>neoformans</i>
5602	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>neoformans</i>
5604	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>gattii</i>
5605	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>gattii</i>
5606	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>gattii</i>
5607	-	+	-	-	+	-	+	+	<i>neoformans</i>
5608	-	-	-	-	-	+	+	+	<i>neoformans</i>
5609	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>neoformans</i>
5611	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>neoformans</i>
5613	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>neoformans</i>
5615	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>neoformans</i>
5616	+	+	-	+	+	+	-	-	<i>gattii</i>
5617	+	+	-	+	+	+	-	-	<i>gattii</i>
5618	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>neoformans</i>
5619	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>gattii</i>
5620	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>gattii</i>
5621	-	-	+	-	-	-	+	+	<i>neoformans</i>
5622	-	+	-	-	+	-	+	+	<i>neoformans</i>
5623	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>neoformans</i>
5624	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>gattii</i>
5625	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>neoformans</i>
5626	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>neoformans</i>
5627	-	+	-	-	+	-	+	+	<i>neoformans</i>
5628	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>gattii</i>
5629	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>gattii</i>
5630	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>neoformans</i>
5631	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>gattii</i>

CGA: Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol

CPA: Canavanina-Prolina-Azul de Bromotimol

GCR: Glicina-Cicloheximida-Rojo de Fenol

GA: Glicina-Azul de Bromotimol

PA: Prolina-Azul de Bromotimol

AC.SUC: Acido Succínico

YEPGE: Agar glucosa peptona con EDTA

YEPG: Agar glucosa peptona sin EDTA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

La búsqueda del antígeno polisacárido capsular, con el mismo reactivo (Pastorex anti-*Cryptococcus*), en 16 muestras de LCR de pacientes con diagnóstico presuntivo de criptococosis se detectó en 4 casos (25%). Estas muestras fueron positivas en el examen microscópico con tinta china, y en el cultivo en agar Sabouraud, formando colonias esféricas, de color crema, ligeramente mucoides. 9 muestras de LCR de pacientes con meningitis bacteriana, dieron reacción de aglutinación negativa, así como también fueron negativos el examen microscópico y el cultivo en agar Sabouraud. (tabla No. 6)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA No. 5

**RESULTADOS DE LOS ANTÍGENOS METABÓLICOS NO PURIFICADOS DE
CEPAS DE *Cryptococcus sp* CON UN MONOCLONAL COMERCIAL (Pastorex
Anti-*Cryptococcus*).**

ANTÍGENOS METABS. CRUDOS	CEPA	AGLUTINACIÓN	ANTÍGENOS METABS. CRUDOS	CEPA	AGLUTINACIÓN
<i>Cryptococcus sp</i>	5601	+	<i>Trichosporon sp.</i>	70	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5602	+	<i>Trichosporon sp.</i>	71	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5604	+	<i>Trichosporon sp.</i>	72	+
<i>Cryptococcus sp</i>	5605	+	<i>Trichosporon sp.</i>	73	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5606	+	<i>Trichosporon sp.</i>	74	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5607	+	<i>Trichosporon sp.</i>	75	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5608	+	<i>Trichosporon sp.</i>	76	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5609	-	<i>Trichosporon sp.</i>	77	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5611	+	<i>Trichosporon sp.</i>	78	+
<i>Cryptococcus sp</i>	5613	+	<i>Trichosporon sp.</i>	79	+
<i>Cryptococcus sp</i>	5615	+	<i>Trichosporon sp.</i>	80	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5616	+	<i>Trichosporon sp.</i>	81	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5617	+	<i>Rhodotorula rubra</i>	2500	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5618	+	<i>Rhodotorula glutinis</i>	2502	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5619	-	<i>Rhodotorula araucariae</i>	2514	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5620	+	<i>Rhodotorula graminis</i>	2524	-
<i>Cryptococcus sp</i>	5621	+	<i>Candida albicans</i>		-
<i>Cryptococcus sp</i>	5622	+	<i>Candida krusei</i>		-
<i>Cryptococcus sp</i>	5623	+	<i>Candida zeylanoides</i>		-
<i>Cryptococcus sp</i>	5624	+	<i>Candida lusitanae</i>		-
<i>Cryptococcus sp</i>	5625	+	<i>Candida guilliermondii</i>		-
<i>Cryptococcus sp</i>	5626	+	<i>Candida tropicalis</i>		-
<i>Cryptococcus sp</i>	5627	+	<i>Candida kefyr</i>		-
<i>Cryptococcus sp</i>	5628	+			-
<i>Cryptococcus sp</i>	5629	+			-
<i>Cryptococcus sp</i>	5630	+			-
<i>Cryptococcus sp</i>	5631	+			-

(+) Reacción positiva

(-) Reacción negativa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA No. 6

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL ANTIGENO CAPSULAR DE *C. neoformans* EN LCR DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE CRIPTOCOCOSIS

MUESTRA DE LCR	AGLUTINACIÓN	EX. MICROSCÓPICO	CULTIVO
1	+	+	+
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	+	+	+
6	-	-	-
7	+	+	+
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	+	+	+
15	-	-	-
16	-	-	-
26	-	-	-
37	-	-	-
40	-	-	-
43	-	-	-
46	-	-	-
48	-	-	-
49	-	-	-
102	-	-	-
113	-	-	-

Reactivo comercial: Pastorex *Cryptococcus*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. DISCUSIÓN.

En los recursos de laboratorio descritos para la identificación de la especie *C. neoformans* y sus variedades, se encontraron grandes variaciones. La presencia de cápsula es una característica estable y confiable para determinar el género *Cryptococcus* (10,15,19). Las cepas estudiadas todas formaron cápsula de diámetro variable, probablemente en los medios el hongo se limita a acelerar su crecimiento, mientras tenga los nutrientes necesarios, no así en el organismo que infecta donde requiere de la cápsula para pasar desapercibido a las defensas del huésped.

El medio sugerido por Staib y colaboradores (25), es un recurso bastante útil y confiable. En éste medio, el difenil fue sustituido por un derivado, el 2,5-difenil oxazol, considerando que los sustratos incluyen un intervalo amplio de compuestos (amino fenoles, amino bencenos y varios compuestos con indol) (15). Los datos obtenidos establecen claramente la separación de las dos variedades. La *var. neoformans* forma colonias de color café, mientras la *var. gattii* exhibe colonias grises que difunden un pigmento verde. El desarrollo abundante se debe a la rápida asimilación de la creatinina. (2) Una de las cepas no utiliza la creatinina presente en el medio, estos aislamientos han sido descritos como cepas mutantes de *C. neoformans* que no sintetizan melanina y su frecuencia es muy rara (15).

La asimilación de azúcares establece la separación de especies (2,15,24), sin embargo los datos obtenidos fueron sumamente variables y sólo en la glucosa se observa el 100% de actividad metabólica. La hidrólisis de maltosa, galactosa, xilosa, trealosa, celobiosa y rafinosa no aportan en éste estudio, ningún carácter diferencial con otras especies, así como tampoco en la separación de sus variedades. La ausencia de actividad en la lactosa confirma el carácter diferencial entre *C. neoformans* y *C. laurentii* (15,24). Esta última especie ha sido aislada por personal de laboratorio de micología del INDR, en duraznos y toronjas, pero no en muestras clínicas, ni en excrementos de aves. La hidrólisis de lactosa ha sido una prueba confiable en su identificación.

La hidrólisis de urea es también una característica muy constante en la especie (15,16,19); reflejándose esto, en las 24 cepas que la asimilan. Una de las cepas (5616) estudiadas no utiliza la urea, la inhabilidad de esta levadura quizás se deba a que sufrió una mutación en sus genes para sintetizar la enzima ureasa y así no poder degradarla. La presencia de estos aislamientos han sido raramente descritos (16,24), sin embargo los datos obtenidos de otras características bioquímicas (asimilación de glicina, prolina, ácido succínico y desarrollo de pigmento en el medio de Staib) permiten definir su determinativa en la especie *C. neoformans var. gattii*. La reacción ocurre entre 48 y 72 horas. Otras levaduras de

importancia médica en los géneros *Trichosporon*, *Rhodotorula* y *Candida* presentan reacciones en mayor tiempo y con menor actividad de la ureasa.

La inhibición de la ureasa es una prueba más confiable para la identificación de las dos variedades. No obstante, en el medio para evaluar esta prueba, 2 cepas de la var. *gattii* no hidrolizaron la urea en el medio sin inhibidor (EDTA). Es probable que la incubación a 37° haya afectado la viabilidad de estas cepas, ya que la var. *gattii* es generalmente sensible a temperaturas arriba de 37° y pudo ocurrir algún incremento de temperatura en la incubadora. A diferencia de este medio, el medio con inhibidor (EDTA) nos permite separar perfectamente a las dos variedades de *C. neoformans*, 10 cepas que resultaron negativas coinciden con las pruebas bioquímicas realizadas (CGA, CPA, ácido succínico) caracterizándolas como variedad *gattii*. Esta prueba en comparación con el medio de glicina canavanina azul de bromotimol presenta una correlación del 100% en la var. *neoformans*, mientras que se encuentra un 9% de falla en el reconocimiento de la var. *gattii*.

Los medios de cultivo propuestos (CGA, GA, CPA, PA y GCR) (17,19) para diferenciar las dos variedades de *C. neoformans* presentan resultados variables. El medio GCA con y sin canavanina ofrece los mejores resultados en las dos variedades, correlacionando las observaciones encontradas en este estudio, con las descritas para este medio.

El medio GCR con ciclohexamida como inhibidor presenta una falla del 43% en la identificación de la var. *neoformans* y un 18% con la var. *gattii*. Estos resultados (30% en promedio), están por arriba del 11% de falla descrito para este medio. (17)

El medio CPA presenta un porcentaje elevado de error en el reconocimiento de las dos variedades; para la var. *neoformans* existe un 65% y para la var. *gattii* del 37%. Estos resultados coinciden con el medio PA sin canavanina. Este medio de cultivo ha sido evaluado con un menor número de cepas de *C. neoformans*. Es probable que las diferencias se deban a que el aminoácido sea más utilizado como fuente de nitrógeno y no como fuente de carbono.

La hidrólisis del ácido succínico revela mayor utilidad que el medio de canavanina con prolina (CPA). Comparado con el medio de glicina con canavanina (CGA) muestra un 100% de correlación en la identificación de la var. *gattii*, mientras que se observa un 29% de discordancia en la var. *neoformans*. Esta diferencia es probable que se deba a que la var. *neoformans* agrupa dos serotipos diferentes; A y D, mientras que el serotipo A no hidroliza el ácido succínico, algunos aislamientos de serotipo D sí lo asimilan (3,17,18); por consiguiente es probable que los aislamientos de la var. *neoformans* encontrados en México se ubiquen en el serotipo D.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

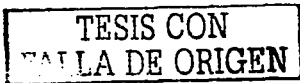
No obstante, que se cuenta con varias pruebas para la identificación de *C. neoformans*, estas presentan diferentes grados de confiabilidad. El uso de anticuerpos monoclonales a la fecha no ha sido utilizado para la identificación del hongo. En este trabajo los resultados con un anticuerpo monoclonal comercial revelan una excelente utilidad. El reactivo comercial (Pastorex anti-*Cryptococcus*) exhibe una sensibilidad del 93% y una especificidad del 100% con especies del género *Candida* y *Rhodotorula*, y un 25% de reacciones cruzadas con el género *Trichosporon*. Este último cruce ha sido ya señalado en investigaciones anteriores (21,34,35), sin embargo los casos de tricosporiosis registrados en la literatura son poco frecuentes. La prueba ofrece varias ventajas: economía, sencillez y confiabilidad, permite la identificación de muchos casos en un corto tiempo, será útil sobre todo en laboratorios de referencia que concentran mayor cantidad de muestras.

El uso del anticuerpo monoclonal en la determinación de antígenos en LCR de pacientes con criptococosis ha revelado una elevada sensibilidad y especificidad. La detección de 4 casos, con examen microscópico y cultivo positivo confirma la utilidad de este recurso. Sin embargo, 12 muestras fueron negativas, lo que puede significar que el cuadro clínico de criptococosis puede no ser tan confiable para establecer un diagnóstico presuntivo. La prueba fue negativa en 9 casos de meningitis bacteriana, lo que demuestra que las reacciones cruzadas no ocurren o se presentan en porcentajes muy bajos.

Los resultados obtenidos en este estudio aportan las siguientes consideraciones: En este grupo de aislamientos no existe un predominio de la variedad *gattii*, como se menciona en la literatura internacional sobre la epidemiología de *C. neoformans* en México. (11,12,24)

Existe un mayor número de aislamientos de la variedad *neoformans* y esta variedad afecta a individuos inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Su presencia en pacientes con SIDA ocurrió en 3 casos; aparentemente su asociación en ellos es baja. No coincide con la frecuencia registrada por otros autores. (6) En México aproximadamente se tienen registrados 51,000* casos de SIDA y *C. neoformans* se ha asociado hasta en un 10% de ellos. Estas observaciones demostraron una elevada frecuencia de criptococosis en México, lo cual no sucede así. Sólo el estudio completo de casos y la identificación confiable de especie y variedad nos permitirá tener la información objetiva y confiable de la criptococosis en México.

*Comunicación personal. Roberto Vázquez Campusano. Jefe del Departamento de Enfermedades de Transmisión Sexual del InDRE.



CONCLUSIONES.

1. Los cultivos monospóricos permiten la obtención de microorganismo puros para determinar en forma confiable sus características bioquímicas. Es un recurso sencillo, rápido y económico.
2. El estudio bioquímico de 25 cepas de *Cryptococcus sp.* establece la identificación de 25 casos por *C. neoformans*. No se encontraron otras especies.
3. La variedad *neoformans* fue encontrada en 14 casos (56%), mientras que la variedad *gattii* ocurrió en 11 casos (44%).
4. Las pruebas más confiables para la determinación de *C. neoformans* son: la hidrólisis de urea, la presencia de cápsula, el cultivo en medio de Staib y el uso de un anticuerpo monoclonal comercial.
5. Las pruebas más útiles para la determinación de la variedad son: el uso del medio con canavanina para la hidrólisis de la glicina, y la inhibición de la ureasa con EDTA.
6. El uso de un anticuerpo monoclonal comercial revela excelente sensibilidad (93%) y especificidad del 100% para la identificación de cepas de *C. neoformans*, con especies del género *Candida* y *Rhodotorula*. Con las especies *beigellii* e *infestans* se presentaron reacciones cruzadas del género *Trichosporon*.
7. El estudio permite contribuir a conocer mayor la epidemiología de *C. neoformans* en México, ya que en la literatura internacional figura con un predominio de la var. *gattii*; en este caso hubo mayores aislamientos de la var. *neoformans*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. APÉNDICE.

1. Medio de Staib (Medio Niger).

Agar	20 g
Dextrosa	10 g
Creatinina	0,78 g
Cloramfenicol	50 mg
Extracto <i>Guizotia abyssinica</i>	200 ml
Agua destilada	800 ml

Autoclavear a 15 lb/15 mins.

Enfriar el medio y adicionar 10 ml de difenil; el cual se prepara disolviendo 0.1 g de difenil en 10 ml de alcohol etílico al 95%; mezclar, homogenizar y distribuir en cajas de Petri.

El extracto de *Guizotia abyssinica* se prepara disolviendo en 350 ml de agua 70 gr de alpiste macerado, se autoclavea a 10 lb/10mins. Se filtra en gasa.

Interpretación:

Desarrollo de pigmento café en las colonias es indicativo que se trata de la especie *Cryptococcus neoformans*.

2. Medio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGA).

El medio cuenta con glicina como única fuente de carbono y nitrógeno y un análogo de la arginina, la canavanina actúa como un inhibidor selectivo y el azul de bromotimol como un indicador de pH.

Preparación.

-Solución A (glicina, L-canavanina)

Glicina	10 g
Fosfato ácido de potasio	1 g
Sulfato de Magnesio	1 g
Solución vitaminada	1 gota
Sulfato de L-canavanina	30 mg
Agua destilada	100 ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NOTA: la solución de vitaminas puede ser reemplazada por 1 mg de tiamina-HCl.

El pH final de la solución A se ajusta a 5.6 y se esteriliza por filtración.

-Solución B (indicador).

Azul de bromotimol sódico	0.4 g
Agua destilada	100 ml

-Para un litro de medio CGB.

Agar bacteriológico	20 g
Solución B	20 ml
Agua destilada	880 ml

Se esteriliza en autoclave por 10 min a 121°C. Cuando el agar se encuentra aproximadamente a 50°C se agregan los 100 ml de la solución A ya estéril.

Interpretación:

Una prueba positiva ocurre por un cambio en el pH del medio desarrollando un color azul cobalto.

Una prueba negativa se caracteriza por un vire verde-amarillo.

3. Medio Glicina-Azul de bromotimol. (GA)

Este medio tiene los mismos componentes que el medio CGA, a excepción del sulfato de L-canavanina que no se le adiciona.

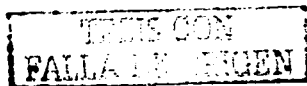
4. Medio Canavanina-Prolina -Azul de Bromotimol (CPA).

El medio cuenta con prolina como única fuente de carbono, la canavanina actúa como un inhibidor selectivo y como indicador de pH el azul de bromotimol.

Preparación:

-Solución A. (prolina-L-canavanina)

Prolina	10 g
Fosfato ácido de potasio	1 g
Sulfato de magnesio	1 g
Solución vitaminada	1 gota



Sulfato de L-canavanina	30 mg
Agua destilada	100 ml

El pH de la solución A se ajusta a 5.6 y se esteriliza por filtración.

-Solución B (indicador).

Azul de bromotimol sódico	0.4 g
Agua destilada	100 ml

-Para un litro de medio.

Agar bacteriológico	20 g
Solución B	20 ml
Agua destilada	880 ml

Se esteriliza en autoclave por 10 minutos a 121°C. Cuando el agar se encuentra aproximadamente a 50°C se agregan los 100 ml de la solución A ya estéril.

Interpretación:

Una prueba positiva en el medio ocurre por un cambio en el pH, desarrollando un color azul cobalto.

Una prueba negativa se caracteriza por un vire verde-amarillo.

5. Medio Prolina-Azul de Bromotimol (PA).

Contiene los mismos reactivos que el medio CPA, a excepción del inhibidor L-canavanina que no se le adiciona.

6. Medio Glicina-Cicloheximida-Rojo de Fenol. (GCR).

La glicina actúa como única fuente de carbono y nitrógeno, la ciclohexamida es un inhibidor selectivo y el rojo de fenol funciona como indicador de pH.

Preparación:

Glicina	10 g
Ciclohexamida	1.6 g/ml
YNB	10 g
Agua destilada	100 ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Disolver la ciclohexamida y glicina en la solución de YNB y esterilizar por filtración.

Interpretación:

Una prueba positiva es dada por el cambio de color del medio de amarillo a rojo.

Una prueba negativa no hay vire en el medio permaneciendo amarillo.

7. Medio Ácido Succínico-YNB-Púrpura de Bromocresol.

El ácido succínico adicionado funciona como única fuente de carbono para la levadura.

Preparación:

a) Medio ácido succínico-YNB

Ácido succínico	0.5 g
YNB	6.7 g
Agua destilada	100 ml

Esterilizar por filtración.

b) Medio base.

Púrpura de bromocresol	0.04 g
Agua destilada	100 ml

Adicionar a cada tubo 2.25ml del medio y esterilizar en autoclave 15lb/15min. Agregar a cada tubo de medio base 0.25ml del medio ácido succínico-YNB. Ajustar pH entre 6.8-7.0.

Interpretación:

Prueba positiva es indicada por el vire del indicador de un color púrpura claro a amarillo.

Prueba negativa no hay vire en el indicador.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

8. Medio Agar Glucosa Peptona Extracto de Levadura sin EDTA (YEPG) y Agar Glucosa Peptona Extracto de Levadura con EDTA (YEPGE).

Fundamento:

El EDTA inhibe a la enzima ureasa de *C. neoformans* variedad *gattii*.

Preparación:

YEPG		YEPGE
3.0 g	Extracto de levadura	3.0 g
5.0 g	Peptona	5.0 g
5.0 g	Glucosa	5.0 g
18 g	Agar bacteriológico	18 g
—	EDTA	0.034 g/l
1000 ml	Agua destilada	1000 ml

Ambos medios se esterilizan en autoclave durante 15 lb/15min

9. Medio Caldo de Urea.

Fundamento: La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea de acuerdo con la siguiente reacción:



El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciendo una alcalinización y un aumento del pH del medio.

Preparación:

Urea	4.0 g
Extracto de levadura	0.02 g
Rojo de fenol	2.0 mg
Fosfato ácido de potasio	0.273 g
Fosfato ácido de sodio	0.285 g
Agua destilada	100 ml

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Disolver los componentes del medio en agua destilada, esterilizar por filtración y ajustar el pH a 6,8.

Distribuir en condiciones estériles en tubos de 14X115 mm en cantidades de 5 ml.

NOTA:

Los organismos que hidrolizan urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en una o dos horas, las especies menos activas pueden requerir tres o más días.

Interpretación.

Reacción positiva -- color rojo magenta del medio.

Reacción negativa-- color naranja claro del medio.

10. Medio Agar Dextrosa Sabouraud (SDA).

Preparación:

Glucosa	40 g
Peptona	10 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH de 5,6.

Suspender todos los ingredientes en agua destilada y dejar hidratar por 10 minutos. Calentar hasta disolución del agar y evitar hervir, esterilizar en autoclave 15lb/15min.

11. Medio Dextrosa Sabouraud Líquido. (SD)

Preparación:

Glucosa	40 g
Peptona	10 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH 5.6 y esterilizar en autoclave 15lb/15min.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

12. Medio base para Carbohidratos.

Preparación:

Carbohidrato	5.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Disolver en baño maría a 56°C y esterilizar por filtración.

Solución 10 X:

YNB	6.7 g
Agua destilada	100.0 ml

Disolver en baño maría a 56°C y esterilizar por filtración.

Solución indicadora púrpura de bromocresol

Púrpura de bromocresol	0.04 g
Agua destilada	100 ml

Esterilizar en autoclave 15 lb/15min.

A los tubos con medio base (0.5ml) agregar 4 ml de la solución indicadora, más 0.5 ml de los diferentes carbohidratos; para tener una concentración final del 2%.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TARJETA BIOQUÍMICA VITEK PARA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS.

La tarjeta bioquímica VITEK está diseñada para ser utilizada conjuntamente con el Sistema VITEK para identificación automatizada de levaduras más frecuentes procedentes de aislamientos clínicos. Los organismos que pueden ser identificados son: *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida humicola*, *Candida lambica*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida para tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida rugosa*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus luteolus*, *Cryptococcus terreus*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum penicillatum*, *Hansenula anomala*, *Pichia ohmeri*, *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca zopflii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimanae*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Trichosporon beigeli*, *Trichosporon pullulans* y *Yarrowia lipolytica*.

Descripción.

La tarjeta bioquímica para levaduras se compone de 30 pocillo, de los cuales 26 contienen medios bioquímicos y 4 contienen medios para control negativo. Requiere 24 horas de incubación y en algunos casos de hasta 48 horas a 30°C, efectuándose la primera lectura a las 24 horas en el módulo lector/incubador de VITEK. Dicha tarjeta está basada en los métodos bioquímicos conocidos de Wickerham y Burton. Estas pruebas incluyen asimilación de carbohidratos (glucosa, galactosa, sacarosa, trealosa, maltosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, rafinosa, trealosa, melocitosa, palatinosa, entre otros), hidrólisis de urea, resistencia a ciclohexamida y reducción de nitratos.

El concepto miniaturizado de la tarjeta logra una reproducción exclusiva de atmósferas favorables que permiten el crecimiento de levaduras fermentadoras y no fermentadoras. Para utilizar la tarjeta es necesario preparar una suspensión equivalente a un patrón McFarland No. 2. Para la identificación final se requiere de un examen microscópico de morfología o pruebas complementarias.

La tarjeta elimina la lectura subjetiva de resultados, reduce la posibilidad de contaminación y al mismo tiempo proporciona un inóculo uniforme en todos los pocillos.

El sistema informático VITEK determina si la reacción en cada pocillo es positiva midiendo la cantidad de luz transmitida a través del medio del pocillo y el correspondiente control negativo. La diferencia en la transmisión de la luz indica crecimiento. Las reacciones son analizadas automáticamente; al finalizar el ciclo de lectura, se imprime automáticamente una identificación para cada tarjeta en el lector/incubador.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11. GLOSARIO.

Agar: sustancia mucilaginoso obtenida de *Gracilaria lichenoides* y de otras algas marinas. Se emplea como un gel de diversos medios de cultivos para hongos, bacterias y otros organismos.

Aglutinación: es la agregación inmunoquímica específica de partículas (bacterias, eritrocitos, coloides sintéticos) cubiertas con antígeno o anticuerpo. Los antígenos o anticuerpos están unidos a dichas partículas mediante fuerzas eléctricas intramoleculares o por uniones químicas covalentes.

Amina: compuesto químico orgánico derivado del amoníaco y uno o varios ácidos.

Aminoácido: compuesto químico que posee simultáneamente caracter de ácido y amina y es uno de los principales constituyentes de la materia viva.

Anticuerpo: es una proteína constituyente del plasma circulante, que es sintetizada por los linfocitos B en respuesta a la introducción de un antígeno.

Anticuerpo Monoclonal: anticuerpo que posee un alto grado de homogeneidad molecular con una estrecha especificidad para un único epitope antigénico, sin reacciones cruzadas.

Antígeno: sustancia capaz de provocar una respuesta inmune. Sustancia que estimula la producción de una proteína específica contra sí mismo.

Asimilación: utilización de (o capacidad para usar) fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento.

Auxonograma: técnica para medir la utilización de carbohidratos.

Biopsia: estudio diagnóstico, por lo común microscópico de una porción de tejido extraída de un cuerpo vivo.

Cápsula: cubierta gelatinosa hialina, que rodea la parte externa de la pared celular en ciertas levaduras (*C. neoformans*) o de las ascosporas de algunos ascomicetes.

Catalizador: sustancia que acelera las reacciones químicas. Participa en una reacción y experimenta cambios físicos durante ella, pero vuelve a su estado original cuando la reacción termina.

Célula: elemento dotado de vida propia, que constituye la unidad estructural, fisiológica y genética de los seres vivos.

Ciclohexamida: agente antifúngico, que inhibe la síntesis de proteínas.

Colonia: conjunto de hifas o células que en gran número crecen, con manifiesta relación entre sí, a partir de un punto, para formar un talo que presenta una morfología característica de la especie.

Cultivo Monospóric: es la separación de una célula para obtener un cultivo puro de un microorganismo.

Determinante Antigénico: es aquella parte de la molécula del antígeno que se une a los anticuerpos.

Enzima: catalizador proteínico producido por las células vivas, para las reacciones químicas que se realizan en los sistemas biológicos; son altamente específicos.

Epitope: es la porción molecular más pequeña de un determinante antigénico que reacciona con un anticuerpo monoclonal.

Estado Perfecto: condición de los hongos que presentan reproducción sexual.

Fermentación: proceso metabólico de óxido-reducción que ocurre en un medio ambiente anaeróbico y en lugar de oxígeno, un sustrato orgánico sirve como el aceptor final de hidrógeno, con producción de gas y ácido.

Granuloma: tumor o neoplasia formado por tejido de granulación. Infiltrado inflamatorio crónico.

Hábitat: nicho ecológico donde el hongo crece y se desarrolla normalmente.

Hongo: organismo eucariote, que posee núcleo organizado, cuya membrana nuclear está bien definida, presentan dos tipos de reproducción, sexual y asexual.

Intradermorreacción: reacción intracutánea inflamatoria que se produce *se practica una inyección en el mismo espesor de la dermis de una pequeña cantidad de toxina o antígeno. Revela si el sujeto sufre o ha sufrido la enfermedad correspondiente y el grado de alergia frente a la misma.

Látex: partícula inerte como bentonita, colodión y carbón, que se utilizan para absorber diferentes grupos de antígenos, incluyendo proteínas, carbohidratos y DNA.

Levadura: organismo unicelular, de la familia de los blastomicetos, que se reproducen por gemación; algunas especies son patógenas para el hombre. Hongo capaz de producir fermentación.

Micología: rama de la ciencia que estudia los hongos y las enfermedades que producen.

Micosis: amplia gama de infecciones del hombre y de los animales superiores, ocasionadas por diversas especies de hongos; basándose en el grado de profundidad anatómica de las micosis, éstas se clasifican en superficiales, cutáneas, subcutáneas y sistémicas.

Neurotropismo: afinidad especial que para el tejido o sistema nervioso poseen ciertas sustancias, microbios, virus, etc.

Oportunista: hongo saprófito que puede ocasionar micosis ante inmunodepresión del huésped.

Saprófito: microorganismo habitualmente no patógeno que utiliza materia orgánica como fuente alimentaria.

Taxonomía: clasificación sistémica de los organismos.

Teleomorfo: estado de reproducción sexual.

Ureasa: enzima que determina la escisión de la urea en amoníaco y anhídrido carbónico y del ácido hipúrico en ácido benzoico y glicocola.

Variedad: cada uno de los grupos en que se dividen algunas especies y que se distinguen entre sí por ciertos caracteres muy secundarios, aunque permanentes.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Arenas Roberto. Micología Médica Ilustrada. Ed. Mc Graw-Hill 1ª ed. México 1993.
2. Bennett, John E., Kwon Chung K.J. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. American Journal of Epidemiology 1977, 105:582.
3. Bennett, John E., Kwon Chung K.J., Theodore T:T. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Sabouraudia 1978, 16:167.
4. Bernard, P. Davis. Tratamiento de Microbiología con Inclusión de Inmunología y genética Molecular. Salvat Editores 2ª ed. España 1978 p. 340-343.
5. Bonifaz Alejandro. Micología Médica Básica. Méndez Editores. 1ª ed. México 1994.
6. Bottone Edward J., Salkin Irak. Serogroup distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. The Journal of Infectious Diseases 1987, 156:242.
7. Buchanan Kent L., Murphy Juneann W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? Emerging Infectious Diseases. 1998 4:71
8. Burgess W.L., Lidell M.C., Summerville A.B. Laboratory Manual for *Fusarium* Research Second Edition. Fusarium Research Laboratory. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology. The University of Sidney Australia. 1988.
9. Carrada, Bravo Teodoro, Del Campo Pérez M. Estudio Epidemiológico del *Cryptococcus neoformans* en México. Revista de Investigación en Salud Pública. 1977, 31:92.
10. Castanon, Olivares LR., López Martínez R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. Mycoses. 1994; 37:325.
11. Castanon, Olivares LR.; López Martínez R, et al. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* an AIDS patient: first observation in Mexico. Journal Medical Veterinary Mycology. 1997; 35:57.
12. Castanon, Olivares LR., Arreguin Espinoza R., et al. Frecuency of *Cryptococcus* species and varieties in Mexico and their comparison with

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- some latin American Countries. Review Latinoamericana Microbiology. 2000; 42:35.
13. Contreras, Pérez Cudberto, Shibayama Hernández Héctor, et al. Manual de Procedimientos de Diagnóstico en Micología Médica. INDRE México 2000.
 14. Fromtling, Robert A., Shadomg Smith, et al. Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* isolated from patients in nonendemic areas. Journal of Clinical Microbiology. 1982; 16:408.
 15. Kaufman, Leo, Cowart Glenda, et al. Evaluation of Comercial Latex Agglutination Test kit for Cryptococcal antigen. Applied Microbiology 1974; 27:620.
 16. Koneman Elmer W., Allen Stephen D. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana. 3ª ed. México 1998.
 17. Kwon, Chung Kyung J., Polacheck Itzhack and Bennett John E. Improved Diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotypes A y D) and *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotypes B y C). Journal of Clinical Microbiology 1982; 15:535.
 18. Kwon, Chung KJ., Bennett JE. Epidemiologic Differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. American Journal of Epidemiology 1984; 120-123.
 19. Kwon, Chung K.J. Bennett John E. Medical Micology. Lea & Febiger. USA 1992
 20. Kwon, Chung KJ., Wickes brian L., et al. Urease Inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Infection and Immunity. 1987; 55:1751.
 21. Litman, Maxwell L., Walter Jinks E. Cryptococcosis: Current Status. American Journal of Medicine 1968; 45:922.
 22. López, Martínez Rubén, Castanon Olivares LR. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetals in México city. Mycopathology 1995; 129:25.
 23. López, Martínez Rubén, Méndez Tovar Luis Javier, et al. Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Ed. Trillas 1ª ed. 1995. México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

24. López, Martínez Rubén, Soto Hernández José Luis, et al. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observations. Mycopathology 1996; 134:61.
25. Martín David W. Bioquímica de Harper. Ed. El Manual Moderno. 9ª ed. México 1984.
26. Mishra, Saroj K., Staib Friedrich, et al. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Germany. Journal of Clinical Microbiology 1981; 14:106.
27. Perfect, John R. Cryptococcosis Infectious Disease Clinics of North America 1989; 3:77.
28. Rinaldi, Michael G., Drutz David J., et al. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. The Journal of Infectious Diseases 1986; 153:642.
29. Rippon, J. w. Medical Mycology. W. B. Sanders. 3ª ed. Philadelphia, USA. 1990.
30. Romero Cabello Raúl. Microbiología y Parasitología Humana. Ed. Médica Panamericana 2ª ed. México 1984.
31. Salkin, Ira F., Hurd Nancy J. New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs. Journal of Clinical Microbiology 1982; 15:169.
32. Shields, Alston B., Ajello Libero. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Reprinted from Science 1966; 151:208.
33. Shimizu, Robyn Y., Howard DH, et al. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. The Journal of Infectious Diseases 1986; 154:1042.
34. Tanner C. David, Weinstein Melvin P. et al. Comparison of Commercial Kits for Detection of Cryptococcal Antigen. Journal of Clinical Microbiology 1994; 32:1680.
35. Ulloa Miguel. Diccionario Ilustrado de Micología. Ed. UNAM 1ª ed. México 1991.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**