



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Serotipificación de aislamientos clínicos de *Cryptococcus
neoformans* por la técnica de aglutinación en látex**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

María de los Ángeles Mondragón Ordóñez



**DIRECTOR DE TESIS:
Méd. Cir. Arturo Rubén López Martínez
2008**



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.

INDICE GENERAL

Resumen	4
Introducción.....	6
Criptococosis.....	8
Variedades y especies.....	15
Serotipos.....	16
Diagnóstico de la criptococosis.....	17
Identificación de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i>	17
Justificación.....	25
Hipótesis.....	26
Objetivos.....	27
Material.....	28
Método.....	29
Resultados.....	32
Discusión.....	42
Apéndice.....	45
Referencias bibliográficas.....	47

RESUMEN

Cryptococcus neoformans y *Cryptococcus gattii* son levaduras capsuladas y principales agentes etiológicos de la criptococosis. Existen dos variedades para *C. neoformans*: var. *neoformans* y var. *grubii*. De acuerdo a la estructura y cantidad de los componentes capsulares, se han descrito cinco serotipos: serotipo A correlacionado con la var. *grubii*, serotipo D correlacionado con la var. *neoformans*, serotipos B y C correspondientes a *C. gattii* y por último, el quinto que es un híbrido, conocido como AD. En México se desconoce la frecuencia de serotipos de esta levadura.

Una de las técnicas utilizadas en la serotipificación de los aislamientos de esta levadura es mediante el uso de kits serológicos, los cuales están basados en la técnica de aglutinación en látex.

En el presente trabajo se estudiaron 150 aislamientos clínicos de *C. neoformans* y *C. gattii* obtenidos de pacientes de diferentes centros hospitalarios de la Ciudad de México. Estos aislamientos fueron purificados, posteriormente identificados por examen directo con tinta china, crecimiento a 37°C y cultivo en agar Níger y en agar canavanina – azul de bromotimol para determinar variedad. Por último se realizó la serotipificación utilizando el Crypto Check latron®.

Los resultados obtenidos revelaron un mayor número de aislamientos correspondientes al serotipo A en un 83% y en menor cantidad al serotipo C encontrándose en el 3% de los aislamientos.

El serotipo D que no había sido reportado en México, con ésta técnica se encontró en un 5% de los casos. Esta técnica resulta

ser útil, rápida y económica para la identificación de los serotipos de esta especie.

INTRODUCCION

Las levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus* se caracterizan por ser redondas y ocasionalmente ovaladas, capsuladas y sensibles a la actidiona, las cuales se reproducen por gemación única, en raras ocasiones se observa gemación múltiple. Existen al menos 38 especies diferentes dentro de este género, pero en el presente trabajo se estudian únicamente las especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

Las levaduras varían en tamaño de 5 a 20 μm , pero debido a la presencia de la cápsula pueden alcanzar hasta los 30 μm . La principal característica de *Cryptococcus* es su cápsula, la cual puede ser vista en una preparación fresca con tinta china.

En 1894, el científico italiano Sanfelice, aisló a partir de jugo de durazno a una levadura capsulada a la cual clasificó como *Saccharomyces neoformans* (Sanfelice, 1895), en ese mismo año, en Alemania, Busse (1894) y Buscke (1895) notificaron, por separado, el aislamiento de una levadura de características similares, a partir de una lesión de la tibia de una mujer de 31 años, estos científicos denominaron a esta levadura como *Saccharomyces hominis* (Buschke, 1895 y Busse, 1894).

En 1901, Jean Paul Vuillemin, en Francia, al realizar estudios de esta levadura, encontró que no producía las típicas ascosporas del género *Saccharomyces* y observó que no fermentaba los carbohidratos, por lo que la clasificó dentro del género *Cryptococcus* (Vuillemin, 1901).

En 1916, Stoddard y Cutler, describieron los aspectos clínicos de la enfermedad ocasionada por este hongo, y le dieron el nombre de *Torula hystolitica* (Stoddard, 1916) ya que observaron una zona lítica alrededor de los tejidos del hospedero, este nombre fue utilizado por un largo periodo.

Rhoda Benham en 1935, definió los caracteres morfológicos, serológicos y los criterios de identificación de más de 40 cepas y concluyó que todos los aislamientos humanos procedían de una misma especie y propuso conservar el nombre de *Cryptococcus neoformans*.

En 1970, F. Gattii aisló de líquido cefalorraquídeo de un niño con meningitis, una variedad de *Cryptococcus* con características morfológicas, bioquímicas, serológicas y epidemiológicas distintas a la variedad *neoformans* por lo que Vanbreuseghem (1970) la nombró como *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* y se correlacionó a esta variedad con los serotipos B y C

Posteriormente en 1999 Franzot propuso la separación de los serotipos A y D de *C. neoformans* var. *neoformans* en las variedades *grubii* y *neoformans* respectivamente en base a la secuencia nucleotídica del gen URA5 (Franzot, 1999).

Recientemente fueron reconocidas dos especies: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* en base a estudios moleculares (como AFLP) ya que los resultados de dichos estudios indicaron que la variedad *gattii* era muy distinta a las otras variedades reconocidas para *C. neoformans* por lo que debía reconocerse como una especie distinta. (Kwon-Chung, 2002)

Actualmente se reconocen dos variedades para *Cryptococcus neoformans*: variedad *grubii* y variedad *neoformans* con tres serotipos: A, D y AD. Los serotipos B y C corresponden a la especie *Cryptococcus gattii*.

Se ha encontrado que los estados perfectos de estas levaduras son: *Filobasidiella neoformas* para la especie *Cryptococcus neoformans* y *Filobasidiella bacillispora* para *C. gattii*. (Kwon-Chung, 1975-1976)

Criptococosis

La criptococosis es una micosis aguda, sub-aguda o crónica que comunmente involucra al pulmón, cerebro, huesos y piel. A principios del siglo XX la criptococosis era considerada como una enfermedad que se presentaba en muy raras ocasiones, sin embargo para 1950 los casos de criptococosis aumentaron dramáticamente y aun mas a partir de 1980 con la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Kwon-Chun, 1992) *C. neoformans* puede infectar tanto a pacientes inmunocompetentes como a pacientes inmunodeprimidos. Aun cuando la criptococosis es una infección pulmonar primaria, la meningitis es la manifestación clínica que se encuentra en mayor frecuencia, mientras que las manifestaciones pulmonares, cutáneas así como la criptococosis ósea y diseminada a otros tejidos ocurren con menor frecuencia. Es importante mencionar que *C. neoformans* es considerado como la especie mas patógena para el hombre seguida de *C. gattii* y en casos excepcionales *C. laurentii*, *C. albidus* y *C. unigutulattus*.

***Mecanismo de infección.**

La infección se adquiere por inhalación de las levaduras, las cuales llegan a los alvéolos pulmonares y a partir de ahí se diseminan vía hematogena al sistema nervioso central. La forma aguda de la enfermedad se da en pacientes con SIDA, aquellos sometidos a tratamiento con corticoides o con neoplasias hematológicas, mientras que en el resto de los casos es común la forma crónica de esta enfermedad (Baró, 1999)

La mayoría de los pacientes presentan signos y síntomas inespecíficos de fiebre, malestar general y cefalea.

Para que se presente esta infección generalmente hay una enfermedad subyacente y los principales factores de oportunismo para la adquisición de ésta son:

* SIDA

- * Terapia prolongada con corticoesteroides
- * Enfermedad de Hodking
- * Leucemia
- * Sarcoma de Kaposi



Fig. 1 Criptococosis cutánea, pulmonar y cerebral.(Figura tomada de http://www.reviberoammicol.com/photo_gallery/Cryptococcus/sp/)

✓ **Factores de virulencia.**

Los factores de virulencia se refieren a la habilidad de un microorganismo para vencer las defensas naturales de un hospedero, de manera que puedan establecerse y provocar la enfermedad.(Perfect, 1995)

En los hongos la identificación de ciertos factores de virulencia y los genes que intervienen es muy compleja y no está bien definida como en el caso de ciertas bacterias. Una infección micótica es generalmente el resultado de un encuentro accidental entre un hospedero y un hongo en el ciclo de vida de este último. Muchos hongos viven como saprobios, sin embargo, muchos otros poseen la habilidad de causar infecciones agudas y crónicas en humanos.(Perfect, 1995)

En el caso de *C. neoformans* y *C. gattii* se encuentran algunas características que están relacionadas con su capacidad para producir enfermedad en el humano. Dentro de ellas la de crecer bien a una temperatura de 37°C o más, temperatura a la que se encuentra el cuerpo de su hospedero, pero además de esto existen dos factores

de virulencia que son particularmente únicos de *C. neoformans* y los cuales no comparte con otros hongos patógenos del hombre; como es la habilidad de producir una cápsula polisacáridica y la capacidad de producir melanina (Baró, 1999)

❖ Cápsula

La cápsula de *C. neoformans* está compuesta por polímeros largos y no ramificados de α -1-3-mananas con monosacáridos ramificados de xylosa y ácido glucorónico. En cuanto al papel que desempeña la cápsula en la naturaleza, es razonable pensar que sirve de protección para la levadura, ya que le permite evitar la desecación y reduce el riesgo de ser ingerida y destruida por amibas existentes en el suelo. (Cherniak, 1980,Cherniak,1994)

Cualquiera que sea la razón evolutiva de su existencia, lo cierto es que esta cápsula es uno de los principales factores de virulencia de *C. neoformans*. Por ejemplo, en criptococosis experimental, mutantes sin cápsula que son producidos por métodos inespecíficos son menos virulentos que las cepas con cápsula que son producidas en modelos animales (Perfect, 1995)

A pesar de que la evidencia experimental confirma que la presencia de la cápsula en *C. neoformans* es requerida para una patogenicidad óptima, no es suficiente para producir la enfermedad; también ha sido claramente demostrado que no existe una correlación directa entre el tamaño de la cápsula y la virulencia de la cepa, así que la sola presencia y el tamaño de la cápsula no aseguran que *C. neoformans* inicie el desarrollo de la enfermedad. De hecho, hay especies del género *Cryptococcus* que producen cápsula, pero no pueden producir enfermedad en el hombre.(Perfect, 1995)

La cápsula de esta levadura debe ser vista como una estructura dinámica, además de que no solo alberga los secretos de la virulencia de esta levadura, también define el serotipo a que corresponde cada organismo. Los filtrados de *C. neoformans* dan por lo menos tres

componentes de la cápsula: glucoronoxilomananas (GXM), galactoxilomananas (GalXM) y manoproteínas (MP). (Kozel, 1989)

GXM. En los cultivos de *C. neoformans* o durante la infección natural la cápsula polisacárida puede solubilizarse y precipitarse por la acción del sobrenadante del cultivo o por los fluidos corporales. El material capsular purificado resultante es un polisacárido de alto peso molecular. La hidrólisis de la cápsula de *C. neoformans* correspondiente a cualquiera de los serotipos conocidos deja como resultado manosa, xilosa y ácido glucorónico. (Kozel, 1989) La GXM es el principal componente de la cápsula polisacárida de esta levadura. (Eckert, 1987) La estructura de las GXMs de los cuatro serotipos difiere en el grado de sustitución de manosil así como de los radios molares de manosa, xilosa y ácido glucorónico, de manera que en los serotipos A y D la GXM está principalmente sustituido en O-2, mientras que en los serotipos B y C son sustituidos en O-2 y O-4. De esta forma los radios molares precisos de xilosa-mansosa-ácido glucorónico en los serotipos D, A, B y C han sido asignados como 1:3:1, 2:3:1, 3:3:3 y 4:3:1 respectivamente. Este componente capsular al parecer es el que juega el papel más importante como factor de virulencia, ya que las GXMs son anti-inflamatorias, antifagocíticas e inmunosupresoras. También es importante mencionar que la correlación entre la virulencia y los serotipos se puede deber a la estructura química de este componente (Kozel, 1989)

GalXM y manoproteínas (MP). La hidrólisis de la cápsula de *C. neoformans* también deja como resultado pequeñas cantidades de otros polisacáridos: GalXM así como manoproteínas. La GalXM está compuesta por manosa, xilosa y galactosa, sin embargo, el porcentaje de composición de estos monosacáridos así como sus enlaces son diferentes que en las manoproteínas. El papel que la GalXM juega en la inmunobiología de *C. neoformans* no se conoce. La MP es el antígeno responsable de la hipersensibilidad ya que la presencia de

éste es importante en la evasión de la respuesta inmune celular, el principal mecanismo de defensa contra *C. neoformans*. Este antígeno se encuentra compuesto principalmente por manosa aunque también se encuentran cantidades considerables de galactosa y xilosa. (Kozel, 1989)

En la tabla No. 1 se reconocen los efectos de la cápsula como factor de virulencia.

Tabla 1. Efectos de la cápsula que contribuyen en la virulencia de <i>C. neoformans</i> (Perfect, 1995)
<ul style="list-style-type: none">❖ Efecto antifagocítico.❖ Interrupción de la cascada del complemento❖ No hay respuesta por parte de los anticuerpos❖ Inhibición de la migración de leucocitos❖ Falta de regulación en la secreción de citosinas❖ Edema cerebral❖ Aumento en la inmunodeficiencia ante infecciones virales

❖ Producción de melanina

Cryptococcus neoformans es la única especie que posee un sistema enzimático que permite que este hongo pueda metabolizar una variedad de catecolaminas en melanina, tal como la dopamina, la dopa, norepinefrina y epinefrina. Estudios bioquímicos inicialmente sugirieron que *C. neoformans* poseía una simple enzima fenoloxidasa (lacasa) que convertía compuestos bifenólicos a través de varias reacciones de auto-oxidación en melanina. La producción de melanina por esta levadura ocurre en presencia de compuesto dihidroxifenólicos o poliaminobenzenos, así como de oxígeno y en

condiciones de baja glucosa. A diferencia de otros hongos, *C. neoformans* carece de la enzima tirosinasa la cual es capaz de producir dihidroxifenoles pero posee una fenoloxidasa que puede oxidar los dihidroxifenoles (Staib, 1987, Denning, 1990)

El dihidroxifenol es oxidado en quinona, el cual espontáneamente es rearrreglado a través de una polimerización secuencial y sufre autooxidación para formar melanocromo y después melanina. Esta propiedad de *C. neoformans* ha sido utilizada como una prueba útil para la identificación de este hongo. Esta característica también se encuentra presente en otros hongos patógenos dematiaceos causantes de feohifomicosis. (Perfect, 1995)

Debe enfatizarse que las lacasas tienen capacidad para oxidar una extensa serie de sustratos. Por ejemplo, en el tejido cerebral hay cantidades significativas de dopa, norepinefrina, epinefrina y dopamina que pueden ser oxidados por esta enzima de *C. neoformans*. Polacheck, 1982 y Kwong-Chung, 1982, realizaron los primeros estudios que identificaron directamente el impacto de la melanina en la virulencia de esta levadura. En estos experimentos se observó que las mutantes albinas eran menos virulentas, así como su tiempo de sobrevivencia también era menor que las cepas originales. Es importante destacar que en estos experimentos cuando los animales recibían a las mutantes albinas, los cultivos de *Cryptococcus* obtenidos del cerebro demostraron que el 50% de las unidades formadoras de colonias se convirtieron en cepas que eran capaces de producir el pigmento, por lo que estas mutantes no solo ganaban la capacidad de producir melanina sino que también era restaurada su virulencia. Estos estudios genéticos y de modelos animales realmente mostraron que la melanina juega un papel importante en la habilidad de *C. neoformans* para producir enfermedad, pero no identifican el mecanismo de protección que la melanina brinda a la levadura (Kwon-Chung, 1982, Polacheck, 1982)

Entonces se realizaron estudios *in vitro* para examinar la importancia patobiológica de la melanina (Perfect, 1995). Los estudios se enfocaron en el papel de la melanina como antioxidante para la protección del hongo contra el daño oxidativo ocasionado por los fagocitos. Estos trabajos sugirieron que la melanina podría actuar como un antioxidante y en particular podría neutralizar los efectos perjudiciales de las catecolaminas bajo ciertas condiciones; otra serie de estudios apoyaron la hipótesis de que la melanina puede proteger a la levadura del daño oxidativo tanto del oxígeno y el nitrógeno a partir de las células del hospedero.

Otro posible mecanismo de la melanina como factor de virulencia es la habilidad de cambiar la carga de la pared celular de manera que la combinación de los polisacáridos y melanina incrementa significativamente la carga negativa de la levadura. En resumen, la melanina previene la respuesta de las células T y la secreción de citosinas, reduce la fagocitosis mediada por anticuerpos o simplemente hace a la levadura más resistente a los tratamientos tales como la anfotericina B.(Perfect, 1995)

Ya que *C. neoformans* tiene una predilección única por el cerebro, la presencia de sustratos para la enzima lacasa en este tejido puede explicar la localización de la infección (Baró, 1999)

Los estudios acerca de la producción de melanina en *C. neoformans* aportan dos beneficios. Primero, que puede ayudar a entender la regulación de la virulencia de esta levadura y segundo que el completo entendimiento de la biología molecular y la bioquímica de la melanina, puede convertirse en una herramienta importante para la producción de antifúngicos contra *C. neoformans* y otros hongos dematiáceos. En la tabla No. 2 se resumen los mecanismos de la melanina en la patogenia de la enfermedad.

Tabla 2. Mecanismos por los cuales la melanina interviene en la patogénesis de la criptococosis

- ❖ Antioxidante
- ❖ Integridad de la pared celular
- ❖ Alteraciones en la carga de la pared celular
- ❖ Interferencia en la respuesta de las células T
- ❖ Reducción de la susceptibilidad ante agentes antifúngicos
- ❖ Protección de temperaturas extremas
- ❖ Disminución de la fagocitosis mediada por anticuerpos

Variedades y especies

Hasta la fecha se reconocen dos variedades de *C. neoformans*, las cuales difieren desde el punto de vista patogénico como de distribución geográfica, de manera que las variedades *neoformans* y *grubii* tienen predilección por individuos inmunosuprimidos, constituyendo los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la población blanco; siendo de esta manera de distribución mundial.(Franzot, 1999)

Las variedades *grubii* y *neoformans* han sido aisladas del suelo donde habitan ciertas aves como la paloma común (*Columba livia*), ya que el excremento de estas aves es una fuente importante de nitrógeno y creatinina para la levadura, sin embargo, las aves no son infectadas por *C. neoformans*, esto pudiera ser debido a la alta temperatura corporal de estos organismos; a pesar de no ser infectadas si son un vector importante de este hongo (Figura No. 2). Las levaduras pueden mantenerse viables en este sustrato durante un largo período de tiempo, incluso años, si se encuentran protegidas de los rayos del sol. (Littman, 1968, Swinne, 1974, Hubaleck, 1975, Cabral, 1999)



Fig. 2 *Columba livia*(Figura tomada de

www.damisela.com/.../columba/livia/f1.jpg)

Por otra parte, el hábitat de la especie *Cryptococcus gattii* es menos conocido, sin embargo, se ha encontrado una relación con la distribución de varias especies de eucaliptos principalmente con las especies *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis*; en estudios realizados en Australia, se comprobó que había una relación entre los aislamientos de pacientes con *C. gattii* y la distribución geográfica de *E. camaldulensis* y que la dispersión de esta levadura se da con el florecimiento del eucalipto ; *C. gattii* se ha descrito en infecciones de pacientes inmunocompetentes y su distribución está más restringida a países tropicales y subtropicales. La criptococosis ocasionada por esta especie *gattii* es de alta morbilidad destacándose la pérdida de visión lo cual no es frecuente en las infecciones ocasionadas por *C. neoformans* var. *grubii* y *neoformans*, las cuales suelen ser mortales.(Ellis, 1990, Pfeifer, 1991)

Serotipos

En *Cryptococcus neoformans*, de acuerdo a la composición de la cápsula, se han descrito dos serotipos distintos denominados A y D, además de un híbrido como tercer serotipo y que es denominado AD. El serotipo A corresponde a la var. *grubii*, el serotipo D a la variedad *neoformans*. Los serotipos B y C se han correlacionado con *C. gattii*. Todos estos serotipos pudieron ser definidos al inmunizar conejos con levaduras inactivadas con formol, los cuales produjeron altos

títulos de anticuerpos y posteriormente se realizó adsorción cruzada de ese suero. (Evans, 1949)

Las cepas correspondientes al serotipo A han sido aisladas a nivel mundial y son las causantes más frecuentes de criptococosis en todos los pacientes infectados o no con VIH. (Kwon-Chung, 1984)

Los aislamientos correspondientes al serotipo D son más comunes en ciertas áreas de Europa, especialmente en Francia, Italia y Dinamarca.(Dromer, 1996) Los serotipos A y D han sido aislados del suelo y del excremento de las palomas. Los serotipos B y C se encuentran principalmente en áreas tropicales y subtropicales y han sido aislados de la naturaleza a partir de eucaliptos.(Ellis, 1990)

Diagnóstico de la criptococosis

El diagnóstico clínico es difícil, ya que las formas de presentación son inespecíficas, por lo que el diagnóstico definitivo es el microbiológico. Debe seleccionarse la muestra según el foco de infección y realizarse los métodos de laboratorio adecuados..

Identificación de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*

Desde el punto de vista bioquímico, *Cryptococcus neoformans* se caracteriza por la incapacidad de fermentar azúcares, la habilidad de asimilar inositol y ser ureasa positiva.(Baró, 1999)

C. neoformans y *C. gattii* son similares en muchas características a otras especies del género. Características tales como la presencia de cápsula, crecimiento a 37°C y la producción de colonias marrón en el medio de agar níger pueden ser clave para la identificación de estas dos especies. Estos hongos también producen una cantidad significativa de ureasa . Zimmer y Roberts en 1979 usaron esta

observación para desarrollar una prueba rápida para la detección de la producción de ureasa a partir de aislamientos de levaduras que pudieran ser después utilizados para distinguir a *Cryptococcus* de otras levaduras ureasa positivas y de las especies de *Candida* que son ureasa negativas. Existen algunos casos en los cuales las cepas de *C. neoformans* son ureasa negativas, pero esto no es muy común. (Zimmer, 1979)

En cuanto a la asimilación del carbono se observa que utiliza galactosa, maltosa, galactilol y sucrosa. Sin embargo, no asimilan lactosa o melódica ni tampoco el nitrato.

⇒ Examen directo de los especímenes

El examen directo de los especímenes con tinta china es un procedimiento particularmente útil y rápido para el diagnóstico de la meningitis provocada por *C. neoformans* y *C. gattii*. Las células encapsuladas se distinguen rápidamente con la tinta china cuando ésta es mezclada con el líquido cefalorraquídeo.

(Figura No.3) Una preparación modificada de tinta china para líquido cefalorraquídeo (LCR), emplea un 2% de mercurio y tinta china, lo cual permite la identificación tanto de estructuras internas y externas de estas levaduras.

El examen directo con tinta china puede dar un diagnóstico inmediato en unos cuantos minutos a partir de una punción lumbar y dar una apreciación clínica de la carga de levaduras en el LCR; este examen directo debe llevarse a cabo como una prueba inicial en todos los especímenes de LCR. (Perfect, 1995, Baró, 1999)

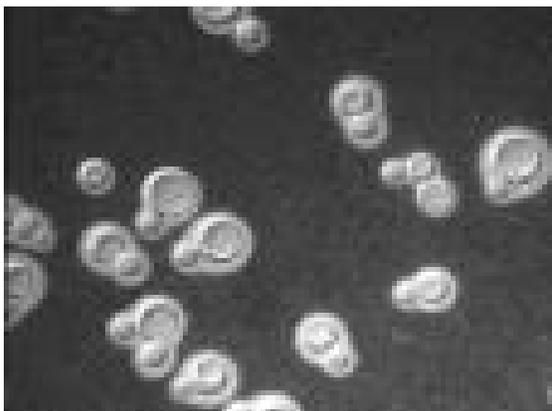


Fig.3 Examen directo con tinta china de *C. neoformans*. (Figura tomada de

⇒ Histopatología

Las levaduras encapsuladas de 5 – 20 µm en tejidos han sido relativamente fáciles de identificar debido a su cápsula prominente; las levaduras han sido identificadas en varios tejidos con tinciones histológicas como el Papanicolaou, hematoxilina – eosina y naranja acridina, así como con tinciones específicas tales como PAS o Gomori-Grocott, las cuales tiñen la pared de los hongos. (Perfect, 1995) La presencia de la cápsula polisacáridica puede evidenciarse mediante tinciones específicas como la de mucicarmin de Mayer. Sin embargo, debe considerarse que existen casos en los cuales las levaduras en los tejidos tienen una cápsula pequeña, por lo que conviene realizar una tinción de Gomori-Grocott para la identificación de la levadura. (Baró, 1999)

En especímenes clínicos, las levaduras son principalmente de forma globosa aunque algunas pueden ser ovaladas o en forma de limón y las levaduras que pertenecen a *C. gattii* pueden también presentar forma elíptica. Algunas ocasiones cuando los especímenes están secos, fijados o teñidos, las células se pueden observar en forma de media luna, haciendo más difícil su identificación.

⇒ Características de crecimiento y medios de cultivo

C. neoformans y *C. gattii* son hongos que provocan enfermedad en mamíferos debido a que de todas las especies del género *Cryptococcus*, son las únicas que pueden crecer a 37°C. Ocasionalmente algunas cepas de *C. albidus* y *C. laurentii* pueden crecer a esta temperatura, pero esta característica no es común para estas especies. Por otra parte la mayoría de las cepas de *C.*

neoformans y *C. gattii* crecen de manera óptima a 30 – 37°C y su crecimiento es estrechamente regulado a estas temperaturas. De hecho, el promedio de crecimiento de muchos aislamientos se ven significativamente reducidos a temperaturas entre 36 y 40°C. *C. gattii* parece ser aún más sensible a las altas temperaturas que las variedades *neoformans* y *grubii*. (Kwon-Chung, 1984, Baró, 1999)

Estas levaduras no toleran condiciones de pH muy ácido (5-7) ni condiciones de pH alcalino, por encima de un pH de 7.6 mueren, también crecen bien en condiciones aeróbicas. Para su crecimiento se requiere crucialmente de la presencia de un poco de hierro en el medio, los cambios en la concentración de hierro pueden afectar la estructura de estas levaduras. Por ejemplo, cuando se encuentra hierro en bajas concentraciones, se estimula la síntesis de la cápsula. (Iralu, 1972)

Los medios de cultivo tradicionales para hongos tal como el agar dextrosa de Sabouraud funciona bien para aislar a *Cryptococcus*, pero cuando se requiere utilizar antibióticos en el medio para reducir la contaminación por bacterias, la mejor opción es el cloranfenicol, ya que la cicloheximida inhibe el crecimiento de estas levaduras. (Baró, 1999)

Las colonias que se desarrollan en el medio son opacas y cremosas de color blanco o amarillento que pueden adquirir una coloración marrón o café después de un largo periodo de incubación.

Existen dos características notables de las colonias, primero la apariencia mucoide; esta apariencia mucoide está directamente relacionada con el tamaño de la cápsula, conforme la colonia madura, las colonias se observan más mucoides. La segunda característica interesante es la sectorización dentro de algunas colonias después de una larga incubación en el agar. Esta sectorización puede dividirse en tres tipos: mucoide, rugosa y cremosa. Este fenómeno se presenta porque algunas células dentro de la población adquieren cápsulas más gruesas o tienden a formar pseudomicelio. (Perfect, 1995)

A pesar de la facilidad para cultivar a *Cryptococcus* en una amplia variedad de medios, incluso en medio mínimo sin vitaminas, existen varios reportes de que el crecimiento de algunos aislamientos clínicos pueden requerir cierta atención particular; por ejemplo, un aislamiento de *C. neoformans* fue incapaz de crecer en agar BHI (infusión cerebro – corazón) pero creció bien en agar dextrosa de Sabouraud. También es importante tomar en cuenta que a pesar de que la mayoría de las cepas pertenecientes a esta especie requieren de algunos días de incubación para observar el crecimiento en el agar, existen cepas que pueden requerir de periodos de incubación más prolongados para producir colonias visibles, en particular si el paciente ha recibido algún tratamiento antifúngico anteriormente.

Los cultivos de *Cryptococcus* deben estar bien ventilados, en agitación (en caso de que el cultivo se haya realizado en caldo) y observarse por 3 o 4 días para la detección del crecimiento de las levaduras.

En la práctica clínica para realizar el aislamiento a partir de especímenes altamente contaminados como esputo o a partir de muestras ambientales, se usan medios selectivos y diferenciales como son el agar níger (Staib, 1962) o el medio de Pal que usa un extracto acuoso de semillas de girasol. El trabajo realizado por Staib en 1962 muestra que la semilla de níger (*Guizotia abyssinica*) puede ser utilizada para explotar la habilidad de esta levadura de metabolizar el ácido cafeico y convertirlo en melanina; *C. neoformans* y *C. gattii* pueden ser identificadas por el desarrollo de colonias de color marrón o café característico en las cajas de agar que contengan este sustrato. Usando el agar níger como medio para el cultivo primario de esputo y orina de pacientes con SIDA se puede incrementar la sensibilidad del aislamiento de *Cryptococcus neoformans*; este medio de cultivo puede ser suplementado con varios antibióticos para minimizar el crecimiento de contaminantes bacterianos. El medio no debe contener más de 0.1% de glucosa para asegurar la activación de la enzima fenoloxidasa por la levadura, la

cual es regulada bajo condiciones de baja glucosa (McFadden, 2001).

El agar canavanina – glicina – azul de bromotimol (CGB) es utilizado para diferenciar a *C. neoformans* de *C. gattii*. Este medio se basa en las diferencias bioquímicas entre estas dos especies. Todos los aislamientos que pertenecen a *C. gattii* pueden usar a la glicina como fuente de nitrógeno además de que son resistentes a la canavanina. En este caso el medio que originalmente es de color amarillo, vira a color azul como resultado de la alcalinización por la liberación de amonio durante la degradación de la glicina. Las variedades *neoformans* y *grubii* no pueden utilizar a la glicina como fuente de carbono o nitrógeno y al mismo tiempo ser resistentes a la canavanina en el mismo medio (Kwong-Chung, 1982). También en medio con D- prolina se puede llevar a cabo la diferenciación de estas dos especies, ya que *C. gattii* utiliza a la D- prolina como fuente de nitrógeno (Dufait, 1987).

⇒ Diagnóstico molecular

Es una herramienta útil para el diagnóstico de las infecciones causadas por hongos principalmente en el caso de aquellas en las que el diagnóstico es difícil con las técnicas convencionales. En el caso de la criptococosis las técnicas de biología molecular podrían obviar algunos inconvenientes que surgen con el resto de las técnicas de diagnóstico y existen estudios recientes que refieren una buena sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares en muestras pulmonares y de LCR. (Rapelli, 1998, Meyer, 2003)

⇒ Detección del antígeno capsular

Entre las pruebas basadas en la detección de componentes fúngicos, se puede encontrar la detección del antígeno capsular de *C. neoformans* y de *C. gattii* por medio de la técnica de látex, que es útil en las muestras de suero, LCR, orina e incluso en muestras de esputo. Esta prueba tiene alta sensibilidad y especificidad además de que se encuentra comercializada; sin embargo, hay que ser cautos en su interpretación ya que se han descrito resultados falsos positivos. Las placas donde se realiza la prueba deben estar libres de restos de desinfectantes y detergentes. La sensibilidad es mayor al 90%, y en los pacientes con SIDA es mayor. La cuantificación de antígeno es útil para controlar la evolución de la enfermedad, ya que los títulos descienden si la respuesta terapéutica es buena y aumenta días antes de que se produzca una recaída. (Goodman, 1971, Mitchel, 1995)

⇒ Serotipificación

Actualmente se han desarrollado métodos de serotipificación comerciales, los cuales permiten determinar de manera rápida y confiable a que serotipo pertenecen diferentes aislamientos de *C. neoformans* y de *C. gattii*, y que incluso nos permiten obviar otras pruebas de identificación puesto que al conocer a que serotipo corresponde determinado aislamiento se puede saber por lo tanto de que especie y variedad se trata.

Uno de estos métodos es el Crypto Check latron® desarrollado por Ikeda, et. al. en 1982 basado en la técnica de aglutinación en látex; este método fue el elegido para realizar el presente trabajo; este método ya había sido utilizado en trabajos anteriores tal es el caso

del propio Ikeda en 1982 quien realizó la serotipificación de 62 aislamientos clínicos obtenidos de pacientes procedentes de Japón y en ese trabajo encontró al serotipo A en mayor porcentaje. (Ikeda, 1982)

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la criptococosis es una de las micosis que se desarrollan en un 10 a 15 % de los pacientes con SIDA y de que su frecuencia ha aumentado en México, se han desarrollado muy pocos estudios epidemiológicos y clínicos en este país y a pesar de que la criptococosis es una enfermedad de distribución mundial, los datos registrados de dicho padecimiento en América Latina son muy limitados. Por lo que las contribuciones en el conocimiento de la epidemiología de la criptococosis son aportes interesantes que permiten conocer la importancia de esta micosis.

HIPÓTESIS

1. Se encontrarán serotipos de *C. neoformans* no reportados actualmente para México, ya que en la literatura sólo se ha reportado la presencia de los serotipos A y BC.
2. Se encontrará un mayor porcentaje del serotipo A (variedad *grubii*), ya que de acuerdo con trabajos realizados anteriormente se sabe que el serotipo A es el más abundante pues es de amplia distribución mundial.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los diferentes serotipos de los aislamientos clínicos de *Cryptococcus* obtenidos de pacientes con diagnóstico de criptococosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la frecuencia de los serotipos en los aislamientos estudiados.
2. Correlacionar la frecuencia de los serotipos encontrados, con la frecuencia en que se presentan las infecciones por *C. neoformans* y *C. gattii*.
3. Demostrar la utilidad de la técnica Crypto Check Iatron® en la serotipificación de *C. neoformans* y *C. gattii*.

MATERIAL

➤ Instituciones participantes

Se utilizaron 150 aislamientos clínicos provenientes de pacientes de cinco centros hospitalarios de la Ciudad de México:

Hospital de Infectología, Centro Médico la Raza, IMSS

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA,

Hospital Regional General Ignacio Zaragoza, ISSSTE

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional, IMSS Instituto Nacional de Pediatría, SSA.

➤ Datos clínicos y demográficos

De dichos aislamientos se tomaron los siguientes datos de los pacientes: sexo, edad, factor de oportunidad y forma clínica.

➤ Determinación de serotipos

Para realizar la serotipificación de tales aislamientos se utilizó el kit serológico comercial Crypto Check latron[®], el cual consta de una placa de vidrio donde se realiza la reacción, así como de los cinco antisueros para determinar los serotipos.

➤ Cepas control

Se usaron siete cepas de especie, variedad y serotipo conocidos, siendo todos los resultados correctos para las cepas control.

MÉTODO

➤ Aislamientos de *Cryptococcus*

Una vez que se tuvieron los aislamientos, se procedió a la purificación de éstos para evitar la presencia de agentes bacterianos, esto se hizo cultivándolos en medio de Sabouraud líquido adicionado con antibióticos antibacterianos, durante tres días en agitación. Una vez realizada la purificación de las levaduras, se procedió a hacer las siembras en placas de agar dextrosa de Sabouraud. El cultivo se realizó con la técnica de estría de aislamiento, para poder obtener una sola colonia o unidad formadora de colonias.

➤ Identificación de género y especie

Para hacer la identificación también se realizaron las siguientes pruebas:

- 1) Tinción negativa, la cual consiste en un examen directo de cada uno de los aislamientos con tinta china, para poner de manifiesto la presencia de la cápsula alrededor de las levaduras.
- 2) Crecimiento a 37°C, para lo cual se realizan siembras de cada uno de los aislamientos en agar dextrosa de Sabouraud, y se incuban a 37°C por 3 días
- 3) Cultivo en agar Níger, en el cual se observan colonias de color marrón características de *C. neoformans* y *C. gattii*.

Después de hacer estas pruebas y comprobar que eran positivas para *C. neoformans* o *C. gattii*, se procedió a realizar el crecimiento de cada uno de los aislamientos en medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol. Se sembraron en cajas de Petri, que contenían este medio y se incuban a 30°C por 3 días para determinar que aislamientos correspondían a *C. gattii* o a *C. neoformans*. Aquellas colonias que viran el medio de color amarillo a azul, corresponden a la especie *C. gattii*

➤ **Determinación de serotipos**

Una vez identificadas especies, se procedió a la serotipificación, para lo cual se utilizó el kit serológico Crypto Check Iatron®, cada kit consta de cinco factores-suero (Factor 1, Factor 5, Factor 6, Factor 7 y Factor 8) y una placa de vidrio para realizar la reacción de aglutinación. El procedimiento fue el siguiente: se colocó en la placa de vidrio una gota de solución salina fisiológica al 0.85%, una asada de la levadura en estudio y una gota del factor suero, primero se analizó con el factor no. 1; todos los aislamientos presentan una reacción positiva, lo cual indica que se trata de *Cryptococcus* y no de otra levadura, posteriormente se analizó el aislamiento con el resto de los sueros y el análisis se muestra en la Tabla .3.

Cuando la reacción es positiva con el factor no. 5 se trata el serotipo B, cuando la reacción es positiva con el factor no. 6, se trata del serotipo C, cuando la reacción es positiva con el factor no. 7 es serotipo A, cuando la reacción es positiva al agregar el factor no. 8 se trata del serotipo D y por último cuando se trataba de un aislamiento correspondiente al quinto serotipo que es un híbrido, la reacción era positiva tanto con el factor no. 7 como con el factor no. 8.

Tabla No. 3 Análisis con el kit Crypto Check Iatron®

SEROTIPO	Factor No. 1	Factor No. 5	Factor No. 6	Factor No. 7	Factor No. 8
A	+			+	
B	+	+			
C	+		+		
D	+				+
AD	+			+	+

RESULTADOS

En la Tabla 4 se anota la frecuencia de las especies y variedades de especies encontradas en los 150 aislamientos estudiados, donde se observa que la mayoría (86.6%) correspondió a la especie *neoformans*. En relación a variedad de especie, la más frecuente fue la *grubii* (94%)

TABLA 4. Número de especies y variedades obtenidas en 150 aislamientos de *Cryptococcus*

Especie	Variedad	No. De cepas
<i>C. gattii</i>		12
<i>C, neoformans</i>	<i>grubii</i>	124
	<i>neoformans</i>	8
	<i>grubii/neoformans</i>	6

En la Tabla 5 se muestra la frecuencia de serotipos identificados, donde el serotipo A fue el más frecuente (83%). El resto de los serotipos B, C, D y AD mostraron una frecuencia muy baja.

SEROTIPO	No. DE CEPAS
A	124
B	8
C	4
D	8
AD	6
TOTAL	150

En la Figura 4 se muestra la frecuencia de los diferentes serotipos.

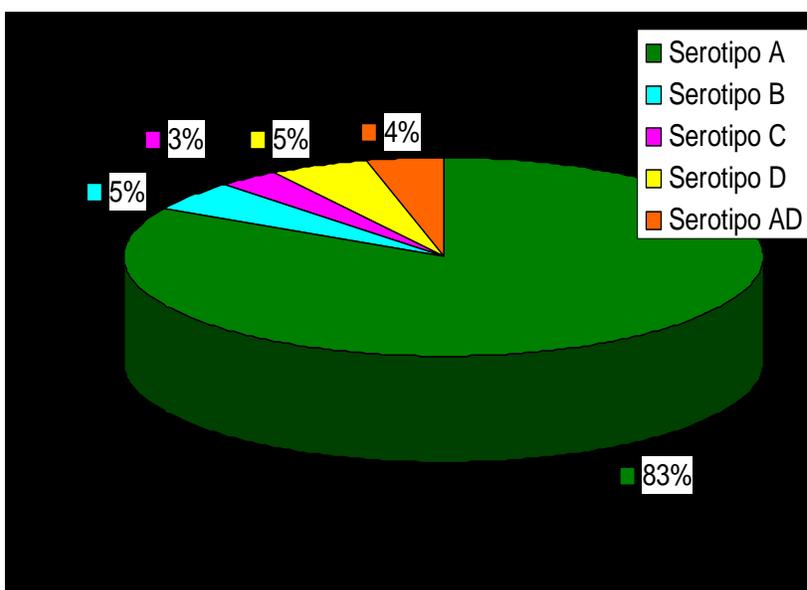


FIGURA 4.
Porcentaje de serotipos encontrados en los 150 aislamientos estudiados

En la Tabla 6 se muestran los serotipos observados en las cepas control, los cuales coincidieron con los datos que se tenían de dichas cepas.

Aislamiento No.	SEROTIPO CONOCIDO	SEROTIPO OBSERVADO
R175	B	B
R148	A	A
R629	D	D
R779	C	C
R628	AD	AD
R626	A	A
R178	B	B

TABLA 6. Serotipos determinados en los aislamientos control.

En cuanto al sexo de los pacientes, fuente de los aislados, hubo un predominio del masculino sobre el femenino con 115 casos (76.7%). Tabla 7.

SEXO	No. Cepas
♀	31
♂	115
Desconocido	4

TABLA 7. Frecuencia de género de los pacientes, fuente de los aislados de *Cryptococcus*

La Tabla 8 muestra los factores de riesgo que presentaban los pacientes estudiados, estuvo relacionada con VIH en un 61.3% de los casos. La mayoría de los pacientes cursaron en el Síndrome de

Inmunodeficiencia Adquirida. Solamente en 14 pacientes (9.4%) aparentemente no se encontró ningún factor predisponente y los aislamientos correspondieron a la especie *Cryptococcus gattii*.

TABLA 8. Factor predisponente registrado para los pacientes.

FACTOR PREDISPONENTE	No. De aislados	Porcentaje
VIH	92	61.3
Ninguno	14	9.4
Desconocido	33	22
Otro	11	7.3

En La Tabla 9 se concentran los datos de especie, variedad de especie, serotipo, sexo, edad, factor predisponente y formas clínicas de los 150 aislados estudiados, donde se puede correlacionar los datos analizados en relación a cada una de las cepas estudiadas. En este cuadro se muestra la correlación existente entre los casos de criptococosis ocasionada por *C. neoformans* var. *grubii* y los pacientes infectados con VIH. También se aprecia que los aislamientos correspondientes a la especie *C. gattii* provienen en la mayoría de los casos de pacientes que aparentemente no presentan ninguna enfermedad subyacente.

TABLA 9. Especie, variedad de especie, serotipo, sexo, edad, factor predisponente y forma clínica en 150 casos.

** Desconocido

N= Ninguno

Cepa No.	Especie y variedad	Serotipo	Sexo	Edad	Factor predisponente	Forma Clínica
1	<i>C. gattii</i>	C	F	**	**	Meningitis
2	<i>neoformans</i>	D	M	**	**	Meningitis
3	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
4	<i>grubii</i>	A	F	24	VIH	Meningitis
5	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
6	<i>grubii</i>	A	M	54	VIH	Meningitis
7	<i>neoformans</i>	D	M	27	VIH	Meningitis
8	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis
9	<i>C. gattii</i>	B	M	**	VIH	Meningitis
10	<i>grubii</i>	A	M	49	Criptococoma	Criptococoma cerebral
11	<i>*grubii/neoformans</i>	AD	M	**	**	Meningitis
12	<i>grubii</i>	A	M	49	VIH	Meningitis
13	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
14	<i>grubii</i>	A	F	30	VIH/Toxoplasmosis	Meningitis
15	<i>grubii</i>	A	M	24	VIH	Meningitis
16	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
17	<i>C. gattii</i>	B	M	24	N	Meningitis
18	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
19	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
20	<i>grubii</i>	A	F	56	VIH -	Meningitis
21	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
22	<i>grubii</i>	A	F	43	VIH	Meningitis
23	<i>neoformans</i>	D	F	45	Neurocisticercosis	Meningitis
24	<i>grubii</i>	A	F	**	**	Meningitis
25	<i>grubii</i>	A	F	**	**	Meningitis
26	<i>grubii</i>	A	M	25	VIH	Meningitis
27	<i>grubii</i>	A	F	64	Cirrosis	Meningitis
28	<i>grubii</i>	A	M	31	VIH	Meningitis
29	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
30	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
31	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
32	<i>grubii</i>	A	M	35	VIH	Meningitis

33	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
34	<i>grubii</i>	A	F	**	VIH	Meningitis
35	<i>grubii</i>	A	M	33	VIH	Meningitis
36	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis
37	<i>*grubii/neoformans</i>	AD	M	**	**	Meningitis
38	<i>*grubii/neoformans</i>	AD	M	**	VIH	Meningitis
39	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis
40	<i>grubii</i>	A	M	33	VIH	Meningitis
41	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
42	<i>*grubii/neoformans</i>	AD	F	29	VIH	Meningitis
43	<i>C. gattii</i>	C	M	44	VIH	Meningitis
44	<i>neoformans</i>	D	M	26	VIH/TB pulmonar	Meningitis
45	<i>grubii</i>	A	M	25	VIH	Meningitis
46	<i>C. gattii</i>	C	M	54	N	Meningitis
47	<i>grubii</i>	A	F	**	**	Meningitis
48	<i>grubii</i>	A	M	53	N	Meningitis
49	<i>grubii</i>	A	M	31	VIH	Meningitis
50	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis
51	<i>grubii</i>	A	M	38	DM	Meningitis
52	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis
53	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis
54	<i>C. gattii</i>	B	M	28	VIH	Meningitis
55	<i>grubii</i>	A	M	42	N	Meningitis
56	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
57	<i>grubii</i>	A	M	27	VIH	Meningitis
58	<i>grubii</i>	A	F	44	VIH	Meningitis
59	<i>grubii</i>	A	M	67	VIH	Meningitis
60	<i>grubii</i>	A	M	24	VIH	Meningitis
61	<i>grubii</i>	A	F	22	VIH	Meningitis
62	<i>grubii</i>	A	F	52	VIH	Meningitis
63	<i>grubii</i>	A	M	50	VIH	Meningitis
64	<i>C.gattii</i>	B	M	26	N	Criptococosis Pulmonar
65	<i>grubii</i>	A	M	30	VIH	Meningitis
66	<i>grubii</i>	A	M	26	VIH	Meningitis
67	<i>grubii</i>	A	M	39	VIH	Meningitis
68	<i>grubii</i>	A	M	30	VIH	Criptococosis
69	<i>grubii</i>	A	M	30	VIH	Meningitis
70	<i>grubii</i>	A	M	24	VIH	Meningitis
71	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
72	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis

73	<i>grubii</i>	A	M	28	VIH	Meningitis
74	<i>neoformans</i>	D	F	35	VIH	Meningitis
75	<i>grubii</i>	A	M	27	VIH	Meningitis
76	<i>grubii</i>	A	M	36	VIH	Neuroinfección
77	<i>grubii</i>	A	F	22	**	**
78	<i>grubii</i>	A	M	28	VIH	Meningitis
79	<i>grubii</i>	A	F	27	VIH	Meningitis
80	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
81	<i>grubii</i>	A	M	27	VIH	Meningitis
82	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis
83	<i>grubii</i>	A	M	38	VIH/DM	Meningitis
84	<i>grubii</i>	A	M	23	VIH	Meningitis
85	<i>grubii</i>	A	M	**	TB Meningea	Meningitis
86	<i>grubii</i>	A	F	**	VIH	Meningitis
87	<i>C. gattii</i>	C	M	**	N	Meningitis
88	<i>grubii</i>	A	M	27	VIH	Meningitis
89	<i>*grubii/neoformans</i>	AD	M	42	VIH	Meningitis
90	<i>grubii</i>	A	M	34	**	Meningitis
91	<i>grubii</i>	A	M	49	VIH	Criptococosis cerebral
92	<i>grubii</i>	A	M	29	VIH	Meningitis
93	<i>grubii</i>	A	M	36	VIH	Infección Sistema Nervioso Central
94	<i>grubii</i>	A	M	35	Plaquetopenia	Criptococosis cerebral
95	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Criptococosis
96	<i>C. gattii</i>	B	F	18	N	Meningitis
97	<i>grubii</i>	A	M	20	N	Criptococosis cerebral
98	<i>grubii</i>	A	M	27	**	Neuroinfección
99	<i>grubii</i>	A	M	50	VIH	Encefalitis
100	<i>grubii</i>	A	F	47	N	Criptococosis cerebral
101	<i>grubii</i>	A	F	30	**	Meningitis
102	<i>grubii</i>	A	M	44	VIH	Criptococosis cerebral
103	<i>grubii</i>	A	M	39	VIH	Criptococosis cerebral
104	<i>grubii</i>	A	F	40	VIH	Meningitis
105	<i>grubii</i>	A	F	39	VIH	Meningitis
106	<i>grubii</i>	A	M	**	**	Meningitis
107	<i>grubii</i>	A	M	46	VIH	Meningitis
108	<i>C. gattii</i>	B	M	27	N	Meningitis
109	<i>grubii</i>	A	M	32	VIH	Criptococosis

						cerebral
110	<i>grubii</i>	A	M	27	VIH	Neuroinfección
111	<i>grubii</i>	A	M	46	**	Criptococosis cerebral
112	<i>grubii</i>	A	**	**	**	Meningitis
113	<i>grubii</i>	A	**	**	**	Meningitis
114	<i>grubii</i>	A	F	27	VIH	Meningitis
115	<i>grubii</i>	A	M	32	VIH	Meningitis
116	<i>grubii</i>	A	M	**	VIH	Meningitis
117	<i>grubii</i>	A	F	15	Corticoterapia	Meningitis
118	<i>grubii</i>	A	M	28	VIH	Meningitis
119	<i>grubii</i>	A	M	67	N	Criptococosis cerebral
120	<i>grubii</i>	A	M	24	VIH	Neuroinfección
121	<i>grubii</i>	A	M	35	**	Meningitis
122	<i>grubii</i>	A	M	34	VIH	Meningitis
123	<i>grubii</i>	A	M	41	VIH	Criptococosis cerebral
124	<i>grubii</i>	A	M	51	**	Criptococosis cerebral
125	<i>grubii</i>	A	**	**	VIH	Desconocido

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos de los pacientes con criptococosis, se confirmó que *Cryptococcus neoformans* fue la especie más frecuente (86.6%), seguida en un 13.4% por *Cryptococcus gattii*, esta última ya había sido reportada en la ciudad de México como agente causante de esta micosis (López Martínez, 1996, Castañón-Olivares 2000, Castañón-Olivares, 1997), lo cual hace variar el concepto que se tenía de que *C.gattii* se encuentra restringida a zonas de clima tropical . La mayor parte de los casos de criptococosis en México se presentan en personas que se encuentran entre la 2ª y 4ª décadas de vida, mientras que la variedad más frecuente de *C. neoformans* es la variedad *grubii* como se esperaba, puesto que ésta tiene amplia distribución mundial (Franzot, 1999). El presente trabajo representa el primer reporte de la variedad *grubii* en México; por otra parte la variedad *neoformans* fue la que se encontró con menor frecuencia. Con respecto al género de los individuos, se observó una mayor frecuencia en el masculino en una proporción 3:1 donde el principal factor de oportunidad que se encontró fue la infección por VIH en un 62.3%, dato que es similar al de otros países, como ocurre en Francia donde el porcentaje de pacientes con SIDA y criptococosis es muy alto (86%), en México existen casos en los que el factor de oportunidad fue el tratamiento con corticoesteroides y la diabetes mellitus entre otros; la forma clínica de criptococosis que se presentó con mayor frecuencia fue la meningo-encefálica en el 96.7% de los casos, lo cual al parecer está relacionado con el hecho de que *C. neoformans* puede evadir la respuesta del sistema inmunitario del hospedero en el líquido cefalorraquídeo ya que la fracción C3 del complemento no se fija sobre la levadura, lo cual si ocurre en el suero (Kozel, 1984), por otra parte, la baja concentración de glucosa en el cerebro favorece la síntesis de la fenoloxidasas, enzima que como ya se mencionó anteriormente está relacionada con la virulencia de estas levaduras, ya que las protege contra ciertas sustancias oxidantes que

pueden actuar como fungicidas (Wang, 1994), otro factor que influye, es la alta concentración de catecolaminas en el cerebro, pues estas aumentan la producción de la cápsula.

En lo que respecta a los serotipos se observó que el serotipo A es predominante en México(83%) al igual que en otros países como se ha reportado en trabajos anteriores, tal es el caso de España donde dicho serotipo se reportó en el 62% de los aislados clínicos (Baró,1999), así como en trabajos realizados en Colombia (Ordóñez,2001), Brasil (Nishikawa, 2003, Calvo, 1990), Japón (Ikeda, 1982) y Francia (Dromer, 1996) en donde se encontró una mayor prevalencia de éste . Hay que hacer mención de que el serotipo D se encontró en un 5 % de los aislamientos estudiados, lo cual representa un dato nuevo e interesante para México, puesto que en la literatura se menciona que este serotipo se encuentra restringido a zonas europeas, tal es el caso de España donde se encontró al serotipo D en un 29% de los aislamientos (Baró, 1999) o en Italia en donde el 71% de los aislamientos corresponden a este serotipo (Griseo, 1997, Tortorano, 1997). Otro dato importante es que en el presente estudio se encontró la presencia de los serotipos B y C en aislamientos clínicos a diferencia de los resultados reportados para España, donde las cepas correspondientes a dichos serotipos fueron aisladas de animales infectados ; no así ocurre en Brasil, donde el 41% de las cepas estudiadas corresponden al serotipo B.

En lo que respecta al kit de serotipificación Crypto Check Iatron®, en base al presente trabajo, se puede concluir que se trata de una herramienta útil en el proceso de serotipificación de aislamientos de *C. neoformans* y *C.gatti*, que ahorra significativamente material y tiempo, lo cual es altamente beneficioso para los laboratorios de diagnóstico micológico y a que se es de fácil manejo y que además permite determinar de manera rápida a que serotipo corresponde cada aislamiento y por consiguiente conocer la variedad de especie

correspondiente, sin necesidad de usar las técnicas tradicionales, ya que al encontrarse presente en los cuatro serotipos el factor antigénico 1, podemos definir que se trata de *Cryptococcus* y al hacer la prueba con el resto de los antisueros, se hace la diferenciación del serotipo y por consiguiente de la variedad a que corresponde cada aislamiento,

La serotipificación de los aislamientos clínicos es importante, ya que hay diferencias en las manifestaciones clínicas y por lo tanto los tratamientos deben ser distintos, ya que en el caso de que se trate de una infección por *C. neoformans*, esta especie es más común en pacientes infectados con VIH o que presentan algún factor de oportunismo y sus consecuencias en la mayoría de los casos son fatales; mientras que *C. gattii* se presenta en individuos inmunocompetentes y las secuelas a nivel del sistema nervioso central son más severas (Dromer, 1996).

Debido a que no se conocen los factores responsables de la diferente distribución de los serotipos y al parecer puede variar con el tiempo (Baró, 1999), es que son necesarios este tipo de estudios que permiten determinar los serotipos de *C. neoformans* y *C. gattii* en distintas partes del mundo.

APENDICE

⇒ Agar níger

La preparación se realiza de la siguiente manera:

50 gr de *Guizotia abyssinica* (semilla de alpiste negro)

18 gr de agar bacteriológico

1000 ml de agua destilada

Se pulverizan la semillas y se ponen a hervir en aproximadamente 400 ml de agua por espacio de 25 a 30 minutos. El concentrado se filtra con gasa para separar las semillas y desecharlas, se afora a 1000 ml y se agrega el agar, se disuelve y se calienta hasta hervir por un minuto.

Se esteriliza el medio en autoclave por 15 minutos a 15 lb de presión. Se vierte en cajas Petri desechables estériles y se mantiene en el refrigerador hasta su uso.

Pueden aplicarse antibióticos cuando se esté a punto de verter el medio, sin olvidar que en el caso de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* no se puede usar cicloheximida por lo que se pueden agregar antibióticos antibacterianos como el cloranfenicol.

⇒ Medio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol

La preparación del medio de CGB se hace de la siguiente manera:

Solución A:

10 gr de glicina

1.0 gr de KH_2PO_4

1.0 gr de MgSO_4

0.001 gr de Tiamina HCl

0.03gr de Sulfato de L-canavanina

100 ml de agua destilada

Se disuelven los ingredientes se esteriliza por filtración con membrana de poro de 0.45 μm . Verificar pH a 5.6.

Solución B:

0.4gr de Azul de bromotimol

64 ml de NaOH 0.01N

36 ml de Agua destilada.

Elaboración:

Se toman 20 ml de la solución B y se agregan 20 gr de agar-agar y 880 ml de agua destilada. Se mezcla calentando hasta la ebullición por un minuto y se esteriliza por 15 minutos a 15 lb de presión.

Una vez estéril se deja enfriar a 50°C y se agregan 100 ml de solución A. Mezclar y verter en cajas Petri desechables estériles, las cuales se mantienen en refrigeración hasta que se utiliza el medio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baró, T Torres TM, Moreira Y, Alía C, López O, and Méndez R. 1999. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. J. Clin. Microbiol 37:1170 – 1172

Benham RW. 1935. Cryptococci, their identification by morphology and serology. J Infect Dis; 57: 255-274

Buschke A. 1895. Über eine durch coccidion hervegerofene krankheit des menshen. Dtsch Med Wochenschr; 21:14

Busse O. 1894. Über parasitare zelle inschlüsse und ihre züchtung zentralbl. Bakteriolog; 16: 175-180

Cabral, LF. 1999 Woods, animals and human beings reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. Rev Iberoam Micol; 16: 77-81

Calvo B., Fishman O., Pignatari A., Del Blanco R., & Zaror L. 1990. Variedades y serotipos de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA y neurocriptococosis en São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo; 32: 480-482

Castañón – Olivares LR, Arreguín-Espinoza R, Ruiz-Palacios y Santos G, López-Martínez R. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in Mexico and their comparison with some Latin American countries. Rev Latinoamer Microbiol 2000; 42: 35-40

Castañón-Olivares L R., López-Martínez R, Barriga – Angulo G and Rios-Rosas C. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient: first observation in Mexico.; J. Med. Ver Mycol. 35: 57 – 59

Cherniak R & Sundstrom B. 1994. Polysaccharide Antigens of the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. Infection and Immunity 62: 1507 – 1512

Cherniak R, Reiss E, Slodski ME, Platner RD and Blumer SO.1980. Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*. Mol Immunol; 17:1025-1032

Denning DW, Stevens SA and Hamilton JR. 1990. Comparison of *Guizotia abyssinica* seed extract(birdseed) agar with conventional media for selective identification of *Cryptococcus neoformans* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol; 28: 2565-2567

Dromer F, Mathoulin, DupontB, Letenneur L, Ronin O, 1996. Individual and enviromental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. Clin Inf Dis; 23: 91 – 96

Dufait R, Velho R and De Vroey C.1987. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline. Mykosen; 30:483

Ellis D, Pfeifer T. 1990. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiology; 7: 1643 – 1644.

Evans EE. 1949. An immunologic comparison of twelve strains of *Cryptococcus neoformans* (Torula histolytica). Proc Soc Exp Biol Microbiol; 71: 644-646

Eckert FT, Kozel TR. 1987. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. Infect Immun; 55:1895-1899

Franzot S, Salkin I, Casadevall A, 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubi*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. J Clin Microbiol; 3: 838 – 840.

Gattii F, Eekels H.1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vullemin, 1894. Part 1: Description of the disease and of the Strain. Ann Soc Belge Med Trop: 50:689-694

Goodman JS, Kaufman L, Koenig MG. 1971. Diagnosis of cryptococcal meningitis. Value of immunologic detection of cryptococcal antigen. N Engl J Med; 285: 434-436

Griseo G and Gallo M. 1997. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental and clinical sources in extreme southern Italy (Calabria and Sicily, central Mediterranean area). Mycoses; 40:95-100

Hubáleck Z and Prikasky Z. 1975. Growth of *Cryptococcus neoformans* in UV-irradiated excreta of pigeons. Folia Microbiol; 20:231-235

Ikeda R, Shinoda T, Nishikawa A and Fukazawa Y. 1980. The serological, chemical and physicochemical analyses of cryptococcal capsular polysaccharides.; Jpn. J. Med Mycol 21: 230 – 238

Ikeda R, Shinoda T, Fukuzawa Y, and Kaufman L. 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 22 – 29

Iralu V. 1972. Enhancement of *Cryptococcus neoformans* capsule synthesis in several media under high carbon dioxide atmosphere. Abstract of American Society of Microbiology. Philadelphia p:130

Kozel TR, Highison B and Stratton CH. 1984. Localization on encapsulated *Cryptococcus neoformans* of serum components opsonic for phagocytosis by macrophages and neutrophils. *Infect Immun;* 43:574-579

Kozel TR. 1989. Antigenic structure of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides. Kurstak E, ed. *Immunology of fungal diseases*, New York Marcel Dekker, 144 -154.

Kwon-Chung KJ. 1975. A new genus *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*.; *Mycologia* 67: 1197 – 1200.

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

Kwon – Chung KJ, Polacheck I & Bennett JE. 1982. Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (Serotypes B and C). *J Clin Microbiol;* 3: 535 – 537.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE.1984. Epidemiological differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol; 120: 123-130

Kwon-Chung KJ and Bennett JE.1992. Cryptococcosis. Medical Micrology. Kwon-Chung, Bennett JE Philadelphia, Lea &Febirger 397-446

Kwon- Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus*. Taxon; 51: 804-806

Littman ML, Borok R. 1968. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathol Mycol Appl; 35: 3311-3312

López- Martínez R, Soto-Hernández JL, Ostrosky ZL, Castañón-Olivares LR, Morales V, Sotelo J. *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observation. Mycopathologia 1996; 134: 61 – 64

McFadden DC, Casadevall A. 2001. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. Medical Micrology 39 Suppl I: 19-30

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E & the IberoAmerican Cryptococcal Study Group Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. Emerging Infectious Diseases 2003 Vol 9; 2: 189 – 195.

Mitchel T, Perfect J. 1995. Cryptococcosis in the Era of AIDS – 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*; Clin Microbiol Rev;8: 515 – 548.

Nishikawa M, Lazera S, Barbosa G, Trilles L, Balassiano B, Macedo R, Becerra C, Pérez M, Cardarelli P & Wanke B. 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns. J. Clin. Microbiol. 41:73 - 77

Ordóñez N & Castañeda E. 2001. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia. Rev. Iberoam. Micol. 18: 128 – 130.

Perfect JR, Kerabchi N, Cox M, Ingram W & Beiser L. 1995. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an Epidemiological Tool. J Clin Microbiol; 12: 3305 – 3309.

Pfeifer TJ, Ellis DH. 1991. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California [letter] J Infect Dis; 163: 929-930

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

Rapelli P, Are R, Casu G, Flori PL, Cappuccineli P and Aceti A. 1998. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol; 36: 3438-3440

Sanfelice F. 1894. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei suchi di alcuni frutti. Ann Igiene; 4: 463-495

Sanfelice F. 1895. Sull'azione patogena dei blastomiceti. Ann Ist Igiene Univ Roma; 5:239-262

Staib F. 1962. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica*. Farbreaktion für *Cryptococcus neoformans*. Z Hyg; 148:466-475

Staib F. 1987. The brown colour effect of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. Zentbl Bakteriologie Hyg A; 266:167-177

Stoddard JL and Cuttler EC. 1916. *Torula* infection in man. Rockefeller Institute for Medical Research. Monograph no. 6: 1-98

Swinne D. 1974. The pigeon as a reservoir for *Cryptococcus neoformans*. Lancet; 2:842

Tortorano AM, Viviani MA, Rigoni AL, et. al. 1997. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV-positive and HIV-negative patients in Italy. Mycoses; 40:297-302

Vanbreuseghem R, Takashio M. 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans*(Sanfelice) Vullemin. Part II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Ann Soc Beig Med Trop; 50: 695-702

Vullemin P. 1901. Les blastomycetes pathogènes. Rev Gen Sci Pures Appl; 12: 732-751

Wang YL, Casadevall A.1994. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun*; 62: 3004-3007

Zimmer BL, Roberts GD. 1979. Rapid selective urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*; 10:380-381