

179
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES
DE Cryptococcus EN MATERIA FECAL
DE AVES DE ZOOLOGICO.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

CLAUDIA RIOS ROSAS

Ciudad Universitaria, D. F.

1992.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

1. INTRODUCCION

1.1 Concepto	1
1.2 Antecedentes históricos	1
1.3 Etiología	5
1.3.1 Taxonomía	5
1.3.2 Morfología	8
1.3.3 Fisiología y Bioquímica	9
1.4 Ecología	11
1.5 Epidemiología	13
1.5.1 Habitat	13
1.5.2 Prevalencia	16
1.5.3 Incidencia	16
1.6 Clínica	19
1.6.1 Criptococosis humana	19
1.6.1.1 Generalidades de la criptococosis como enfermedad	19
1.6.1.2 Criptococosis pulmonar	20
1.6.1.3 Criptococosis del sistema nervioso central	20
1.6.1.4 Criptococosis cutánea y mucocutánea	22
1.6.1.5 Criptococosis ósea	24
1.6.1.6 Criptococosis visceral	24
1.6.2 Criptococosis en animales	25

1.7 Diagnóstico	26
1.7.1 Exámen directo	27
1.7.2 Cultivo	28
1.7.3 Análisis del L.C.R.	29
1.7.4 Pruebas serológicas e inmunológicas	29
1.8 Tratamiento	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivos generales	33
3.2 Objetivos particulares	33
4. MATERIAL Y METODOS	34
4.1 Aislamiento	34
4.1.1 Procedencia	34
4.1.2 Colecta	34
4.1.3 Procesamiento de las muestras	35
4.2 Purificación de las cepas	35
4.3 Identificación	36
4.3.1 Identificación macroscópica y microscópica	36
4.3.1.1 Presencia de pigmento café en el medio de Agar-creatinina- <i>Guizotia abyssinica</i>	36
4.3.1.2 Presencia de cápsula (Tinción negativa con tinta china)	37
4.3.2 Pruebas bioquímicas y fisiológicas	37

4.3.2.1 Hidrólisis de urea (Producción de ureasas)	37
4.3.2.2 Crecimiento en presencia de cicloheximida	38
4.3.2.3 Crecimiento a 37°C	38
4.3.2.4 Asimilación de fuentes de carbono (Método Wickerham-Auxanograma)	39
4.3.2.4.1 Preparación del inóculo	39
4.3.2.4.2 Siembra en tubos Wickerham	39
4.3.3 Patogenicidad experimental en ratón	40
4.3.3.1 Preparación del inóculo	40
4.3.3.2 Inoculación experimental	40
4.3.3.3 Registro de datos	41
4.3.3.4 Subcultivos	42
4.3.4 Pruebas comprobatorias utilizadas en la identificación de especies de <i>Cryptococcus</i>	43
4.3.4.1 Producción de pseudomicelio	43
4.3.4.2 Formación de tubo germinal	43
4.3.4.3 Pigmentación en agar malta	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Aislamiento	45
5.2 Purificación	47
5.3 Identificación	48

5.3.1 Identificación macroscópica y microscópica, pruebas bioquímicas y fisiológicas	48
5.3.2 Patogenicidad experimental en ratón	51
5.3.2.1 Subcultivos	53
5.3.3 Pruebas comprobatorias utilizadas en la identificación de especies de <i>Cryptococcus</i>	54
6. DISCUSION	56
7. CONCLUSIONES	61
8. ANEXOS	63
ANEXO 8.1	63
ANEXO 8.2	66
9. BIBLIOGRAFIA	72

1. INTRODUCCION

1.1 CONCEPTO

La criptococosis (enfermedad de Busse-Buschke, torulopsis, blastomicosis europea) es una infección crónica subaguda o rara vez aguda pulmonar, generalizada o meníngea causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* y ocasionalmente por *C. albidus* (24)(36)(40)(48) y *C. laurentii* (50)(73).

La infección primaria en el hombre es casi siempre pulmonar seguida de la inhalación de la levadura. La infección pulmonar usualmente es subclínica y transitoria. Se caracteriza por diseminar con clara predilección al sistema nervioso central y afecta principalmente a personas inmunodeprimidas.

La enfermedad en los animales es muy similar a la presentada en el hombre. La inoculación cutánea y mucocutánea es común y se caracteriza por la presencia de lesiones localizadas en piel, así como en las mucosas oral y nasal. La infección en los bovinos por lo común afecta al tejido mamario y los ganglios linfáticos adyacentes (32)(41)(61).

1.2 ANTECEDENTES HISTORICOS

1894. Busse, un patólogo, y Buschke, un cirujano, publican separadamente el aislamiento de la levadura a partir de la tibia de una mujer. Se describe y nombra al organismo *Saccharomyces*,

- adoptando el término de *sacharomicosis hominis* para la enfermedad. Las lesiones fueron descritas como gomosas y sarcomatosas. Posteriormente algunos autores utilizaron el nombre de "neoformans" (Causante de cáncer o de tumor) como un epíteto para el organismo.
1894. San Felice aisló una levadura capsulada a partir de jugo de durazno. la cual causó lesiones en animales infectados experimentalmente. Denominó al organismo *Saccharomyces neoformans*.
1896. Curtis describe un caso similar al de Busse y Buschke y denomina al organismo como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*.
1901. Vuillemin transfiere a la levadura al género *Cryptococcus*, al examinar diversos cultivos y no observar ascosporas características del género *Saccharomyces*. Denomina como *C. hominis* a los aislamientos de Busse-Buschke y Curtis y como *C. neoformans* para el aislamiento de San Felice.
1901. Klein realiza el aislamiento a partir de leche.
1905. Von Hansemann observa por primera vez el microorganismo asociado a un caso de meningitis.
1914. Verse reconoce por primera vez un caso antemortem con afección al sistema nervioso central.

1916. Stoddard y Cutler delinear las diferencias clínicas y patológicas entre criptococosis, blastomicosis y otras micosis. Asumen erróneamente que las cápsulas de las levaduras fueran quistes en el tejido causadas por la acción digestiva del hongo ("histolítico") y denominaron al organismo *Torula histolytica*. Baker y Haugen desacreditan la acción "enzimática" y definen los principales tipos de lesiones patológicas: gelatinosas y granulomatosas.
1935. Benham aclara la confusión existente entre blastomicosis y criptococosis. Demuestra que el tipo cutáneo de criptococosis europea, era causada por el mismo microorganismo que producía la forma meningítica más comúnmente reportada en América.
1950. Evans descubre los serotipos A, B, y C, en base al estudio de los componentes de la cápsula.
1955. Emmons describe el aislamiento de la levadura a partir de nidos y materia fecal de pichones.
1968. Wilson y Bennet descubren un cuarto serotipo: serotipo D.

1970. Lodder y Kreger Van-Rij determinan la prioridad del nombre *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin.
- Benham describe cuatro serotipos de *C. neoformans*: A, B, C, y D. Estos son reconocidos dentro de dos variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D) y *C. neoformans* var. *gatii* (serotipos B y C).
1975. Kwon-Chung muestra el estado perfecto o estado teleomórfico de la levadura. Define como *Filobasidiella neoformans* representante teleomórfico de *Cryptococcus neoformans*.
1982. Ikeda y cols establecen los patrones antigénicos de los cuatro serotipos de *C. neoformans* y adiciona un quinto serotipo, A-D.

En México, González Ochoa (1955) presentó dos comunicaciones de casos de criptococosis localizados en cerebro. Y en 1959, A. González-Mendoza y R. Pérez-Tamayo presentaron un tercer caso de criptococosis generalizada diagnosticada por necropsia.

1.3 ETIOLOGIA

Cryptococcus neoformans es considerado fundamentalmente el principal agente etiológico de la criptococosis. Sin embargo, otras especies pueden ocasionalmente ser agentes causales de la enfermedad en el hombre y los animales, como *C. albidus* (24)(36)(40)(48) y *C. laurentii* (50)(73).

Por instancia, *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. lactativorus*, *C. terreus* y *C. uniguttulatus* han sido aislados ocasionalmente a partir de esputo, lavados bronquiales, material de biopsia, fluido cerebro-espinal y orina de pacientes severamente inmunodeprimidos por enfermedades debilitantes o asociados a terapia con corticosteroides (16)(42). Algunas especies han sido aisladas a partir de casos de mastitis bovina (32) (42).

1.3.1 Taxonomía

De acuerdo con Phaff y Fell (42) el género *Cryptococcus* incluye 17 especies válidas y seis variedades. Así mismo, 39 sinónimos han sido registrados para *C. neoformans*.

Kreger Van-Rij describe al género *Cryptococcus* como un grupo compuesto de levaduras con gemación multipolar, pseudomicelio ausente o muy rudimentario, blastoconidios frecuentemente capsulados; generalmente, en medio sólido se observan colonias mucoides, amarillentas, incapaces de fermentar carbohidratos, con una variable capacidad para

utilizar nitratos como fuente de nitrógeno, y capaces de asimilar inositol (42).

Cryptococcus junto con los géneros *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*, *Malassezia* y *Rhodotorula* forman parte de la familia Cryptococaceae, del orden Cryptococcales, dentro de los Blastomycetes (31)(Tabla 1).

Algunas especies de *Cryptococcus* tienen representantes teleomórficos en la familia Filobasidiaceae, en el orden Ustilaginales de la clase Heterobasidiomycetes (Tabla 1).

Estas levaduras son la fase haploide en el ciclo de vida, generalmente de basidiomicetes heterotálicos (2).

La familia Filobasidiaceae se caracteriza por la formación de basidios no septados, estrechos, con basidiosporas sésiles terminales. Pueden formarse las blastosporas en las hifas, pero no se producen teliosporas. La familia incluye dos géneros *Filobasidium* (tres especies) y *Filobasidiella* (una especie representante) (2)(62).

En el ciclo de vida heterotálico de las especies de este género, las células se aparean opuestamente desarrollándose un micelio dicariótico con conexiones en grapa (fíbulas), se forma un basidio estrecho, se presenta la cariogamia y posteriormente tiene lugar la meiosis (31)(38).

En *Filobasidium*, se forman cuatro a diez basidiosporas sésiles, en forma de espiral petaloide en el ápice del basidio;

TABLA 1
CLASIFICACION TAXONOMICA DE ALGUNAS
ESPECIES DE *Cryptococcus* EN SU FASE
ANAMORFICA Y TELEOMORFICA

Superreino: Eucarionta

Reino: Fungi

División: Eumycota

ESTADO ANAMORFICO (FASE ASEXUADA)

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Blastomycetes

Orden: Cryptococcales

Familia: Cryptococcaceae

Género: *Cryptococcus*

Especies de *Cryptococcus*:

neoformans

albidus

laurentii

uniguttulatus

luteolus

lactativorus

terreus

entre otras.

ESTADO TELEOMORFICO (FASE SEXUADA)

Subdivisión: Basidiomycotina

Clase: Heterobasidiomycetes

Orden: Ustilaginales

Familia: Filobasidiaceae

Género: *Filobasidiella* y

Filobasidium

Especies de *Filobasidiella*:

neoformans

Especies de *Filobasidium*:

floriforme

uniguttulatus

capsuligenum

Basado de Herrera y Ulloa (31)

en *Filobasidiella* en el ápice del basidio se forman cuatro largas cadenas de basidiosporas por gemación basipeta a partir de cuatro sitios diferentes.

Filobasidium floriforme (Olive) es la fase teleomórfica de *Cryptococcus albidus*. *Filobasidium uniguttulatus* (Kwon-Chung) pertenece a fase anamórfica de *C. uniguttulatus*. La tercera especie del género *Filobasidium*, *F. capsuligenum* (Rodríguez de Miranda), no ha sido aislada en su fase levaduriforme haploide; Fell et al. la clasifican dentro del género *Leucosporidium*. El estado perfecto de *C. laurentii* es desconocido. Kurtzman descubrió tipos de apareamientos entre las cepas de *C. laurentii*, las cuales después de la fusión producen un micelio dicariótico con conexiones en grapa, con un septo doliporo, pero no esporas sexuales (62).

El género *Filobasidiella* tiene una única especie representante *Filobasidiella neoformans* con dos variedades *neoformans* y *bacillispora*. Estas son diferenciadas por la forma de las basidiosporas y por algunas características fisiológicas como son la asimilación de ácido málico, glicina y creatinina (30)(37)(49)(71). *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* es el estado perfecto de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* de *Cryptococcus neoformans* var. *gatii* (38).

1.3.2 Morfología

No existen en esencia, diferencias morfológicas entre las variedades de los estados anamórficos o asexuales de *Cryptococcus neoformans* así como de otras especies del género.

C. neoformans crece en medios de cultivo habituales: Sabouraud dextrosa agar (SDA), infusión cerebro-corazón (BHI) y extracto de levadura. En el medio de SDA a temperatura ambiente y a 37°C. genera colonias con una coloración blanca a amarillenta, lisas, mucoides, limitadas, brillantes, ligeramente convexas y tienden a escurrir sobre el medio de cultivo. Otras especies de *Cryptococcus* presentan un aspecto similar (11)(46).

Microscópicamente, *C. neoformans* se presenta como una levadura esférica u ovoide de 3 a 7 micras de diámetro. se reproduce por gemación multipolar y está rodeada de una cápsula mucilaginoso con la cual llega a medir de 15 a 20 micras de diámetro tanto en tejido como en condiciones adecuadas de cultivo.

Esta cápsula de naturaleza heteropolisacárida está constituida de una cadena principal de D-manosa en un enlace $\alpha(1-3)$ conformando numerosas ramificaciones de D-xilosa y ácido D-glucurónico. Dentro de ciertas condiciones de crecimiento la cápsula puede también contener compuestos almidonados, los cuales son liberados al medio de cultivo. Diversas especies del

género también producen cápsula.

El estudio de la estructura inmunológica de la cápsula permite definir los serotipos A, B, C, D y AD; estos serotipos difieren en su conformación antigénica, actividad bioquímica y metabólica e incluso por sus características epidemiológicas. *C. neoformans* var. *neoformans* incluye los serotipos A, D, y AD. Y *C. neoformans* var. *gatii* incluye los serotipos B y C (4)(33). Las principales diferencias entre los serotipos de *C. neoformans* se presentan en la Tabla 2.

1.3.3 Fisiología y Bioquímica

En la identificación de *C. neoformans* y de otras especies del género, además de demostrar sus características morfológicas se deben de realizar diversas pruebas bioquímicas y fisiológicas (49)(71)(69).

La capacidad de *C. neoformans* para crecer a 37°C en SDA es un criterio importante para la identificación, puesto que permite diferenciar a esta especie patógena de las no patógenas que generalmente son incapaces de crecer a ésta temperatura. La temperatura óptima de crecimiento para *C. neoformans* es de 29°C y su límite superior de tolerancia al calor es de 39°C; se obtiene un crecimiento abundante a 37°C (44). *C. laurentii* y *C. luteolus* en ocasiones presentan un escaso crecimiento a 37°C (11)(42) y *C. albidus* y *C. lactativorus* también crecen a 37°C

TABLA 2
 PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE LOS
 SEROTIPOS DE *C. neoformans*

	SEROTIPOS A Y D	SEROTIPOS B Y C
Forma perfecta o fase sexualizada	<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>
Habitat natural	Suelo, materia fecal de aves	Desconocida
Repartición geográfica de casos clínicos	Estados Unidos de América, Francia, Europa	Africa, China, Asia, Sur de California
Temperatura de crecimiento	Se desarrolla bien a 30°C y 37°C	Desarrollo moderado a 30°C y lento a 37°C.
Morfología	Forma redonda	Forma oblongada
Características bioquímicas	L-malato negativo en 48 horas, CGB negativo a la coloración azul	L-malato positivo en 48 horas, CGB positivo a la coloración azul
Patogenicidad en ratón	Fuerte	Débil

Tomado de Drouhet et al. (18).

GGB: CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BRONOTIMOL

(32)(42)(44).

Las especies de *Cryptococcus* son sensibles a la cicloheximida (actidiona) por lo cual en medios que contengan este antibiótico no se desarrollan.

La prueba de producción de ureasas es útil especialmente en la diferenciación de especies de *Cryptococcus* con otras especies de levaduras incluyendo *Candida*. Conjuntamente con *C. neoformans*, las especies saprobias de criptococos también producen ureasas. Las especies más comunes del género *Candida* excepto *C. krusei* son ureasa negativas. Tabla 3.

La asimilación de nitrógeno es una característica estable de las levaduras, es un medio útil para la diferenciación del género y especie. *C. neoformans* no asimila nitratos a diferencia de otras especies del género. Tabla 4.

C. neoformans emplea creatinina como fuente de nitrógeno. Staib comprobó que dicha especie utiliza el extracto de las semillas de niger (*Guizotia abyssinica*) y producen un pigmento café a partir de fenoles contenidos en las semillas (54)(78). Otros miembros del género como *C. laurentii* y *C. albidus* ocasionalmente pueden producir pigmentación a partir de este sustrato (15)(68).

Las pruebas de asimilación de fuentes de carbono tienen gran valor taxonómico, especialmente en los casos en que la fermentación es ausente. Las pruebas de asimilación de azúcares

TABLA 3
CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE
ALGUNAS ESPECIES DE LEVADURAS

ESPECIE	PRESENCIA DE NÍCCLIO	PRESENCIA DE CAPSULA	HIDROLISIS DE UREA	SENSIBILIDAD A LA CICLOHEXIMIDA	PRESENCIA DE COMPUESTOS CAROTENOIDES	ASIMILACION DE INOSITOL
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	+	+	+	0	+
<i>Cryptococcus</i> sp.	0	+	+	+	0	+
<i>Rhodotorula</i> sp	0	+/0	+	+/0	+	0
<i>Trichosporon cutaneum</i>	+	0	+/0	0	0	+
<i>Torulopsis glabrata</i>	0	0	0	+	0	0
<i>Candida albicans</i>	+	0	0	0	0	0

Tomado de Lodder (42); Campbell (11); Rippon (61)

TABLA 4
 CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE
 ALGUNAS ESPECIES DEL GENERO
Cryptococcus

ESPECIE DE <i>Cryptococcus</i>	PIGMENTO EN EL MEDIO DE NIGER	HIDROLISIS DE UREA	CRECIMIENTO A 37°C	REDUCCION DE NITRATOS
<i>C. neoformans</i>	+	+	+	0
<i>C. albidus</i> var. <i>albidus</i>	0	+	+/0	+
<i>C. albidus</i> var. <i>diffluens</i>	0	+	+/0	+
<i>C.</i> <i>uniguttulatus</i>	0	+	0	0
<i>C. laurentii</i>	0	+	+/0	0
<i>C. terreus</i>	0	+	0	+
<i>C. luteolus</i>	0	+	+/0	0
<i>C.</i> <i>lactativorus</i>	0	+	+/0	0

Tomado de Lodder (42) y Campbell (11).

como fuentes de carbono son usadas para diferenciar especies, en este caso particular de *Cryptococcus*. La prueba de asimilación de inositol es un criterio importante para diferenciar a las especies de *Cryptococcus* con especies de *Candida* y *Torulopsis* que son inositol negativas (56)(57). Tablas 3 y 5.

La incapacidad de *C. neoformans* y en general de otras especies del género para producir micelio o pseudomicelio, en los medios habituales de laboratorio, es una característica importante y una útil prueba comprobatoria en la identificación, con esta prueba podemos diferenciar a las especies de *Cryptococcus* de las especies de *Candida* (11)(42). No obstante, se debe tomar en cuenta que algunos criptococos producen un pseudomicelio muy rudimentario.

1.4 ECOLOGIA

Las palomas (*Columba livia*), parecen jugar un papel importante en la diseminación y mantenimiento de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en la naturaleza (1)(19)(20)(58)(59)(64)(65). La levadura ha sido recuperada en materia fecal de palomares, áticos de edificios viejos, cúpulas y cornisas. Es frecuente la presencia del microorganismo en sustratos alcalinos, altamente nitrogenados, ricos en sales, en oscuridad y con humedad moderada. Sin embargo, la materia

TABLA 5

ASIMILACION DE FUENTES DE CARBONO
 POR ALGUNAS ESPECIES DEL
 GENERO *Cryptococcus*

Tomado de Lodder (42) y Campbell (11)

ESPECIES	ASIMILACION									
	SAC	DEX	GAL	MAL	LAC	RAF	CEL	TRIA	XIL	IND
<i>C. neoformans</i>	+	+	+	+	0	+/0	+	+	+	+
<i>C. albidus</i> var. <i>albidus</i>	+	+	0/+	+	+/0	+	+	+/0	+	+
<i>C. albidus</i> var. <i>diffuens</i>	+	+	0/+	+	0	+	+	+	+	+
<i>C. luteolus</i>	+	+	+	+	0	0/+	+	+	+	+
<i>C. laurentii</i>	+	+	+	+	++	0/+	+	+	+	+
<i>C.</i> <i>uniguttulatus</i>	+	+	0/+	+	0	+/0	+/0	+/0	+	+
<i>C. terreus</i>	+/0	+	+/0	+/0	+/0	0	+	+	+	+

Asimilación: 0 = no se observa crecimiento

+ = se observa crecimiento

++ = asimilación fuerte

IND = INOSITOL

SAC = SACAROSA

DEX = DEXTROSA

GAL = GALACTOSA

MAL = MALTOSA

LAC = LACTOSA

RAF = RAFINOSA

CEL = CELOSIOBA

TRIA = TRIALOSA

XIL = XILOSA

fecal seca también puede contener levaduras viables y virulentas. En estado libre la levadura tiene un diámetro no mayor a una micra, lo que permite sea inhalada hacia los espacios alveolares. En este nicho ecológico particular, *C. neoformans* es capaz de sobrevivir o competir con otras especies. Los criptococos " mueren" cuando se exponen directamente con el suelo, esto es debido a que son fagocitados y digeridos por amibas del suelo, particularmente por especies de *Acanthamoeba*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* entre otras especies de bacterias (10)(64)(65).

En materia fecal húmeda o seca permanece viable por varios meses; en sitios que no están en contacto con el suelo el microorganismo se establece y sus probabilidades de sobrevivencia aumentan por un incremento relativo de humedad. El pH de la materia fecal así como la concentración de creatinina y ácido urico influyen en la distribución de la levadura. La exposición directa a la luz solar, especialmente en verano, es hostil a *C. neoformans*, sin embargo, se conserva en sitios similares durante el invierno (61)(64).

En ambientes saprobios, las levaduras son esencialmente no capsuladas, la presencia de cápsula y el tamaño de ésta, parece ser un factor significativo de patogenicidad (4)(33).

Aunque *C. neoformans* está estrechamente asociada con palomas no es capaz de causarles infección, debido a la alta

temperatura corporal (40-42°). Swinne-Desgain (80), Guiguen C. (27), Abou-Gabal (1), Hermoso de Mendoza (29), en diversos estudios indican que *C. neoformans* puede permanecer viable en el tracto gastrointestinal del ave. Estas observaciones sugieren que las palomas actúan como acarreadores biológicos del hongo.

1.5 EPIDEMIOLOGIA

1.5.1 Habitat

Desde 1955, Emmons (20) encontró la relación ecológica entre *C. neoformans* y la materia fecal cuando por primera vez realiza el aislamiento de la levadura asociado a palomas.

Staib (74)(77)(78) menciona que *C. neoformans* tiene predilección por la materia fecal de palomas y otras aves debido a que la levadura utiliza creatinina como fuente de nitrógeno. La materia fecal provee un excelente medio de cultivo para *Cryptococcus* spp.

Desde entonces el habitat natural de la levadura en diversas fuentes naturales ha sido discutido. La recuperación de *C. neoformans* se ha realizado a partir de diversos sustratos naturales considerados como probables fuentes de infección. Las principales fuentes naturales a partir de las cuales se ha realizado el aislamiento de *C. neoformans* son : suelo (41)(42)(54), aire (42) (75), frutas y vegetales (55), y

productos lácteos (32)(42). Pero, definitivamente, el habitat natural más importante para la recuperación de la levadura es la materia fecal de las aves, principalmente palomas.

En estudios realizados en los parques zoológicos de Amberes (5), El Cairo (59), Nueva Delhi (26), Berlín (77), se indica la presencia de *C. neoformans* en materia fecal de diversas especies de aves, entre las que destacan canarios, loros, pericos, periquitos australianos, las cuales constituyen un sustrato nutritivo para la levadura. Por lo tanto, la materia fecal de otras especies de aves diferentes a palomas son también una fuente natural importante para su aislamiento.

Es importante resaltar que *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D) ha sido aislada a partir de estas fuentes naturales y que *C. neoformans* var. *gatii* (serotipos B y C) ha sido aislada únicamente a partir de material clínico, por lo que su habitat natural es desconocido (18).

El aislamiento de otras especies de *Cryptococcus* de importancia médica, se ha efectuado también a partir de materia fecal y tracto digestivo de palomas (27)(59). En un estudio realizado por Gallo et al. (22) en Turín, se indica la presencia de levaduras patógenas en materia fecal de palomas semi-domesticadas en ocho áreas densamente pobladas de esta ciudad; se aisló una gran cantidad de colonias de *Cryptococcus albidus*, y *Cryptococcus laurentii* además de *C. neoformans* entre

otras especies de interés clínico. Por otra parte, Bangert et al.(3) estudiaron la materia fecal de 61 psitaciformes clínicamente sanos; se aislaron bacterias y algunas colonias de *C. laurentii* y *C. albidus*, a partir de 13 cultivos. En este trabajo se discute el significado de los microorganismos aislados como patógenos potenciales.

En nuestro país se han efectuado algunos estudios al respecto. En 1986, Rendón-Rojas (60) realizó un estudio en 118 muestras de materia fecal de palomas y 53 de gallinas provenientes del Estado de México, Hidalgo y Distrito Federal. Se informa de una frecuencia de aislamientos de *C. neoformans* de un 14.4% obtenida únicamente a partir de palomas. Y en 1989, López-Martínez y Castañón-Olivares (13) informan sobre el aislamiento de *C. neoformans* indicando que de un total de 283 muestras estudiadas de materia fecal de palomas de diferentes sitios públicos de la Ciudad de México, 66 muestras (23.3%) fueron positivas. Se considera que esta frecuencia representa un riesgo potencial para la adquisición de la criptococosis, sobre todo en la actualidad cuando se puede apreciar un incremento de la enfermedad en pacientes con SIDA. En otro estudio, López-Martínez y Castañón-Olivares (43) aislaron a la levadura a partir de diversas frutas (toronja, fresa, lima, entre otras) en un 9.45% y vegetales (remolacha, col, coliflor, tomate y otros) con una frecuencia del 4.33%, lo cual indica

que esta levadura se encuentra muy ampliamente distribuida en la naturaleza, aun cuando el habitat vegetal no es tan importante en la epidemiología de la criptococosis.

1.5.2 Prevalencia

La criptococosis en el hombre y otros mamíferos ha sido informada en todas las regiones del mundo a excepción del ártico y antártico (18)(25)(34)(51)(70)(71).

Como se ha mencionado anteriormente, existen cinco serotipos de *C. neoformans* agrupados en dos variedades. La distribución geográfica de los serotipos es muy importante desde el punto de vista epidemiológico ya que presentan diferencias considerables. En relación a los datos clínicos se indica una distribución universal para *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D, y AD) y una distribución limitada a regiones tropicales y subtropicales para *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C) (6)(7)(18)(19)(34)(39)(70)(81)(82).
Tablas 2 y 6.

1.5.3 Incidencia

La criptococosis es una micosis oportunista que actualmente presenta una mayor frecuencia. Esta enfermedad ha sido observada particularmente en pacientes inmunodeprimidos, asociados a leucemias, linfomas, sarcomas, enfermedad de

TABLA 6
DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS
SEROTIPOS DE *C. neoformans*

AREA GEOGRAFICA	SEROTIPOS A-D Nº DE CASOS	SEROTIPOS B-C Nº DE CASOS
Bur de California	22	25
Resto de EEUU	205	14
Tailandia (Hong-Kong, Malasia)	17	13
Africa (Zaire)	20	6
Japón	52	0
Alemania	17	0
Suiza	12	0
TOTAL	345 (85.60%)	58 (14.40%)

Tomado de Scholer (70)

Hodgkin, a pacientes con corticoterapia, y a partir de 1980 se ha visto un gran incremento en la incidencia en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En efecto, la criptococosis representa el tercero o cuarto tipo de infección oportunista después de neumonía por *Pneumocystis carinii* y candidiasis de esófago, entre este tipo de pacientes (14)(17)(35)(53)(76)(79)(83).

La incidencia de la criptococosis es más alta especialmente en continentes extra-europeos. Tabla 7.

No existe una relación significativa entre la incidencia de la criptococosis y la raza, ni predisposición ocupacional. Se ha descrito con mayor frecuencia en el sexo masculino que en el femenino en una relación de 2:1. En lo que respecta a la edad, existen informes de casos desde recién nacidos hasta ancianos (8)(61)(84).

En México, debido a que no se ha realizado un estudio epidemiológico completo, se desconoce la verdadera frecuencia de la criptococosis así como la distribución de las variedades de *C. neoformans*, solo se cuenta con algunas comunicaciones al respecto. Cano-Domínguez et al. (12) informan sobre casos de criptococosis asociados con el SIDA, en los que la micosis fue la manifestación inicial. El diagnóstico se estableció en 23 (6%) de 380 casos de SIDA, 22 de ellos hombres, atendidos en el Hospital de Infectología, Centro Médico "La Raza" del IMSS, en

TABLA 7
 ZONAS GEOGRAFICAS DE DISTRIBUCION
 DE LA CRIPTOCOCOSIS

BAJA INCIDENCIA	ALTA INCIDENCIA
1 - 2 casos/1 000 000 de habitantes por año	12 casos/1 000 000 de habitantes por año
Estados Unidos de América	Australia
Gran Bretaña	Sureste asiático (Malasia)
Suiza	Japón
Francia	Africa del Norte (Zaire)

Tomado de Kaufman y Blumer (34)

el período comprendido de enero de 1984 a noviembre de 1988.

Vergara-Takahashi (84) realiza un análisis epidemiológico para conocer la frecuencia de la criptococosis en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional del IMSS en el período comprendido de junio de 1986 a noviembre de 1989. Los resultados de este estudio indican que de 2074 estudios micológicos, 489 (23.5%) correspondieron a pacientes con diagnóstico de meningoencefalitis de etiología a determinar, de los cuales en seis casos (1.2%) se observaron levaduras en líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) y se cultivó *C. neoformans*. Un caso correspondió a criptococosis cutánea. Los factores predisponentes asociados a la enfermedad incluyeron: SIDA, enfermedades debilitantes y tratamiento con glucocorticoides.

En lo que respecta a la prevalencia de las dos variedades en nuestro país, los estudios realizados comprueban la existencia tanto de la variedad *neoformans* como de la *gatif*. Hernández- Gómez (28) realizó un estudio con 28 cepas de *C. neoformans* obtenidas de casos humanos; veinticinco de estas cepas correspondieron a la var. *gatif* y sólo tres a la var. *neoformans*. Por el contrario, Garza G. et al. (23) realizaron un análisis de 31 cepas aisladas de pacientes con SIDA, en el que observaron un predominio de la variedad *neoformans* (26 cepas) sobre la variedad *gatif* (5 cepas).

1.6 CLINICA

1.6.1 CRIPTOCOCOSIS HUMANA

1.6.1.1 Generalidades de la criptococosis como enfermedad

La infección primaria es casi siempre pulmonar seguida de la inhalación de las levaduras, sin embargo, es posible que pueda existir vía de entrada cutánea y mucocutánea, pero es considerada extremadamente rara. La infección primaria pulmonar puede permanecer localizada o diseminarse a otros órganos.

La intensidad y prevalencia de los signos y síntomas presentados en el hospedero en cualquiera de las etapas de la enfermedad dependen de diversos factores entre los que destacan: la condición inmunológica del paciente y la virulencia de la cepa. En pacientes inmunocompetentes, la infección se resuelve rápidamente con mínima sintomatología y puede evolucionar en forma subclínica. Y en pacientes inmunodeprimidos, o bien, asociados a neoplasias y a enfermedades debilitantes, la infección disemina fácilmente e involucra a casi todos los órganos con particular predilección al sistema nervioso central (8) (52) (66) (67).

De acuerdo con Rippon (61), los tipos clínicos de criptococosis son: pulmonar, del sistema nervioso central (SNC), cutánea y mucocutánea, ósea y visceral.

1.6.1.2 Criptococosis pulmonar

Usualmente (95% de los casos) cursa como asintomática o subclínica, o bien, con síntomas inespecíficos que únicamente definen alteraciones de tipo pulmonar, la mayoría tiende a la curación espontánea; los casos sintomáticos se manifiestan desde estados leves a graves. La sintomatología leve simula un cuadro gripal, acompañado de tos, fiebre y discreto dolor pleural. Al intensificarse el proceso la fiebre es más constante, hay pérdida de peso, astenia, adinamia y tos con esputo mucoso o hemoptoico. Después de la ruptura de focos dentro de ramas bronquiales, existe una abundante descarga de esputo mucoso conteniendo numerosas células fúngicas.

1.6.1.3 Criptococosis del sistema nervioso central (S.N.C.)

Esta es la variedad más frecuentemente diagnosticada. Se origina a partir de un foco pulmonar con posterior diseminación hematogena. La razón por la predilección de *Cryptococcus* por el sistema nervioso central no ha sido satisfactoriamente explicada. La neurofilia se le ha atribuido a diversas razones como son: 1) La levadura probablemente encuentra menor respuesta celular (fagocitosis) debido al desarrollo de la cápsula, 2) La presencia de factores selectivos nutricionales para la levadura, es decir, fuentes de nitrógeno como la

asparagina y creatinina que se encuentran en el fluido espinal y pueden estimular su crecimiento, y 3) La ausencia de factores de inhibición en suero o en líquido cefalorraquídeo (factor anticriptocócico).

La criptococosis del sistema nervioso central presenta tres formas o variedades clínicas, éstas son: meningitis, meningoencefalitis y criptococomas.

-Meningitis

Es la forma clínica más frecuente, generalmente se manifiesta en forma crónica y gradual. La sintomatología predominante es cefalea intensa (usualmente frontal), fiebre constante, dolor orbital intermitente, y mal estado general. En la forma crónica de la enfermedad se presenta rigidez y dolor de nuca, y son positivos los signos de Kerning y Brundzinski, e hipertensión intracraneal. Al intensificarse el padecimiento los pacientes presentan gran pérdida de peso, astenia, adinamia, vómito constante, vértigo, delirio, alucinación, irritabilidad, convulsiones, pérdida temporal de la memoria, síntomas oculares como neuroenitis, fotofobia, estrabismo, etc. Los pacientes en estado severo generalmente manifiestan coma y mueren por insuficiencia respiratoria.

-Meningoencefalitis

Es una entidad clínica poco común de curso agudo y fulminante, al desarrollarse la infección, el enfermo cae rápidamente en coma y muere en corto tiempo. Los síntomas y signos presentes en la meningoencefalitis aguda son: náuseas, vómito, hipertensión intracraneal, parálisis, sopor, coma; las manifestaciones oculares son : vértigo, visión borrosa, diplopia, fotofobia, oftalmoplejía; los disturbios mentales son: irritabilidad, agitación, apatía, confusión, alucinaciones, psicosis, epilepsia, etc.

-Criptocomas o granulomas criptococales

Es una entidad clínica rara, se forman lesiones cerebrales que conforman masas fúngicas desarrolladas en forma de abscesos. Los pacientes presentan los mismos signos y síntomas que en las otras dos variedades clínicas del sistema nervioso central. El curso de la enfermedad es grave y los pacientes caen en coma, paro respiratorio y muerte.

1.6.1.4 Criptococosis cutánea y mucocutánea

Las variedades clínicas de la enfermedad: cutánea y mucocutánea en el hombre son usualmente una manifestación de la diseminación de la enfermedad y ocurre en un 10 al 15% de los casos.

La forma cutánea primaria es una entidad clínica rara y se inicia por la inoculación del hongo vía cutánea a través de una solución de continuidad formándose un complejo primario similar al de la esporotricosis, se forma una lesión inicial o chancro, que puede involucionar o formar lesiones granulomatosas como pápulas, pústulas acneiformes o abscesos ulcerados. La topografía depende del sitio de inoculación que regularmente son las extremidades superiores o inferiores.

La criptococosis cutánea secundaria es más común que la anterior, se origina a partir de la diseminación hematógica o linfática de la criptococosis pulmonar, meníngea y/o ósea. La topografía preferente es en cara, cuello y extremidades. Las lesiones son similares a las de la forma primaria: pápulas acneiformes, abscesos, o ulceraciones superficiales con evidente necrosis, pero también ocurren como lesiones trombóticas profundas o con apariencia de una celulitis.

La criptococosis cutánea secundaria a diferencia de la variedad primaria, tiene mal pronóstico.

La criptococosis primaria y secundaria cutánea son manifestaciones clínicas regularmente encontradas en pacientes inmunodeprimidos.

Las lesiones mucocutáneas ocurren con menor frecuencia que las cutáneas. Estas se presentan como nódulos, granulomas o como ulceraciones superficiales o profundas y son secundarias a

otros focos de infección. Se localizan principalmente en labio y nariz.

1.6.1.5 Criptococosis ósea

Es una entidad relativamente frecuente. aproximadamente cerca del 5 al 10% de los casos de criptococosis tienen compromiso óseo. Se origina por la diseminación hematógena a partir de un foco pulmonar o meníngeo. Como en otras enfermedades causadas por hongos, los criptococos tienen una afinidad por los huesos prominentes, craneales, vértebras y huesos largos. Las lesiones son usualmente múltiples, discretas, diseminadas, destructivas, crónicas y poco cambiantes. Pueden afectar articulaciones y se presenta periostitis, osteofibrosis y osteólisis, en este tipo de lesiones existe diseminación frecuente a piel originando fístulas que drenan material seropurulento mucoso. Los síntomas más frecuentes son intenso dolor óseo y artralgias.

1.6.1.6 Criptococosis visceral

En las formas diseminadas, cualquier órgano o tejido del cuerpo puede tener focos de infección. Invade prácticamente todos los órganos de la economía sobresaliendo hígado, intestinos, bazo, corazón, testículos, próstata, etc. Se producen lesiones de tipo granulomato-gelatinosas.

Sintomáticamente e histológicamente semejan neoplasias particularmente de tipo mixomatoso.

1.6.2 CRIPTOCOCOSIS EN ANIMALES

Los casos animales de criptococosis han sido informados en forma esporádica desde 1898. Un interés sobre las micosis animales se ha desarrollado desde entonces. Uno de los primeros registros de infección criptococósica se realizó de un caso de lesión mixomatosa en un toro (61). En 1902, Frothingham aisló a la levadura de una lesión pulmonar en un equino. Holzworth fue el primero en informar de la criptococosis en un gato, en 1952. Y en 1953, Seibold y colaboradores describieron por primera vez la criptococosis en un perro (32)(41).

La mastitis criptococósica en vacas lecheras es una forma común y su distribución es mundial. En 1952, Pouden y colaboradores informaron una enzootia en la cual 106 vacas fueron afectadas en un hato de 235 vacas Holstein-Friesian.

Barron en 1953, revisó la literatura mundial de la criptococosis en animales y notó que como en las infecciones humanas, la afección al sistema nervioso central es una manifestación común. Las lesiones pulmonares y las infecciones generalizadas fueron descritas conjuntamente con la afección al sistema nervioso central. Otros sitios de infección son ojos y piel. Barron describió nuevos casos de criptococosis en cerdo

doméstico, leopardo, mono, mono tití y en un gato de algalia.

Littman y Zimmerman en 1956 agregan otras referencias de casos animales a la revisión de Barron que incluyen el mono (mangabey tizado), el zorro, el cobayo y el hurón. Ajello en 1958, refiere casos en gacelas, cabras, koalas, mink y canguro. Rippon (61) menciona la existencia de casos en caballos, delfines y leopardos.

Un sólo caso de criptococosis ha sido descrito en aves, en una grulla coronata o pichón coronado de Beccari (21); la infección se limitó al tejido subcutáneo bajo del ojo, donde la temperatura fue inferior a 40°C.

Aun cuando los pulmones son probablemente el sitio de infección inicial, en varios informes de la enfermedad sobre todo en caballos, gatos y perros, se han encontrado lesiones prominentes en la región facial, nariz, paladar duro y piel, lo que supone una inoculación directa. Por otro lado, se han descrito granulomas masivos en estómago e intestinos lo que sugiere una puerta de entrada por tracto gastrointestinal (45)(47)(63).

1.7 DIAGNOSTICO CLINICO

La toma de productos va a depender de la variedad clinica de criptococosis, las muestras más utilizadas para efectuar el diagnóstico son: esputo, pus, sangre, exudados, orina, líquido

cefalorraquídeo (L.C.R.), costras o escamas de lesiones cutáneas, material de biopsias, etc. (8)(46)(61).

La criptococosis pulmonar es una forma poco diagnosticada, sólo puede ser diferenciada de otras alteraciones pulmonares por la demostración del hongo mediante su observación microscópica (Tinta china o mucicarmina de Mayer) y cultivo. Las infecciones asintomáticas sólo se pueden demostrar mediante el estudio radiológico del tórax y las pruebas serológicas positivas.

La forma de criptococosis más frecuentemente diagnosticada es la meníngea o del sistema nervioso central, mediante el análisis bioquímico y las características del líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) y por la prueba de aglutinación de partículas de látex.

1.7.1 Exámen directo

A partir de los diversos productos biológicos infectados, se realiza un frotis o un montaje húmedo de preferencia. Para realizar este último se toma cualquiera de los productos líquidos infectados y se realiza un extendido en una gota de tinta china o nigrosina que puede estar diluida con agua. Se examina al microscopio para demostrar la presencia de células encapsuladas. Con esta prueba se observa el cuerpo de la levadura, algunas ocasiones gemando, rodeada por la cápsula.

Diversas fuentes reportan buenos resultados con la tinción de mucicarmina de Mayer. Otras tinciones alternativas se realizan con Grocott-Gomori, azul de alcian y PAS (Acido peryodico de Schiff) (8)(46)(61).

1.7.2 Cultivo

Para efectuar el aislamiento del hongo, los materiales clínicos se siembran en estría en el medio de Sabouraud dextrosa agar (SDA) y se incuban tanto a temperatura ambiente así como a 37°C. En el medio de SDA se desarrollan colonias blancas y cremosas, brillantes con una superficie elevada y la periferia lisa. El exámen directo en esta etapa de crecimiento revela por lo general que las cápsulas no están bien desarrolladas, después de cinco a siete días más de incubación las colonias se vuelven mucoides, desarrollan una convexidad progresiva y toman un color crema a moreno, y la cápsula aumenta de tamaño (32)(61).

C. neoformans tiene requerimientos por la tiamina y la adición de extracto de levadura o el empleo de medios enriquecidos como el agar infusión cerebro-corazón (BHI) estimula el crecimiento y la producción de cápsulas. Después del aislamiento inicial, las colonias pueden ser sembradas en estría en BHI. Cuando se incuba a 37°C en éste medio se generan colonias cremosas, mucoides, opacas, elevadas y circulares en

48 a 72 horas (61).

También se puede realizar el aislamiento primario de *C. neoformans* a partir de material clínico muy contaminado utilizando el medio selectivo de Staib (Agar creatinina-*Guizotia abyssinica*) (76), obteniendo así colonias con una pigmentación café o incluso utilizar el medio propuesto por Shields y Ajello (11) (72) adicionando al extracto de la semilla de niger, difenil y cloranfenicol que actúan como inhibidores de mohos y bacterias.

1.7.3 Análisis del L.C.R.

Debido a que la mayoría de las criptococosis diagnosticadas son meníngeas, el análisis del líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) es de gran utilidad en el diagnóstico. Dicho análisis revela alteraciones características en este fluido. Tabla 8.

1.7.4 Pruebas serológicas e inmunológicas

Ninguna de las pruebas inmunológicas desarrolladas hasta el momento ha dado resultados completamente satisfactorios. Las pruebas de intradermoreacción no presentan importancia desde el punto de vista diagnóstico y epidemiológico puesto que por un lado, existe una baja respuesta humoral o alérgica causada por la naturaleza del material capsular y porque se han demostrado

TABLA 8
ALTERACIONES DEL LIQUIDO
CEFALORRAQUIDEO EN LA CRIPTOCOCOSIS

-
- Claro
 - Turbio cuando hay numerosas levaduras y leucocitos
 - Celularidad (800 X mm³): linfocitos
 - Proteínas elevadas: 40 mg a 600 mg /100 ml
 - Cloruros bajos: 183 mEq/l
 - Glucosa baja: 10 mg a 20 mg / 100 ml
-

Tomado de Rippon (61)

diversos cruces inmunológicos.

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico son : Aglutinación de partículas de látex (AL), inmunofluorescencia indirecta (IFA) y fijación de complemento (RFC), siendo la más sensible y específica la primera (61).

La presencia de antígeno es determinada por la aglutinación de partículas de látex (AL). En este procedimiento una suspensión de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos anticriptococcus, obtenida de conejos inmunizados, es mezclada con suero o fluido espinal del paciente. La aglutinación de partículas de látex es considerada una reacción positiva.

Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFA) y fijación de complemento (RFC) son usadas para determinar la presencia de anticuerpos.

Para evaluar el progreso del paciente durante la terapia, la prueba de AL es de mayor utilidad. Un buen pronóstico es indicado por el decremento en los títulos de antígeno y la persistencia de títulos altos durante el curso de la terapia denotan un mal pronóstico y la probabilidad de una recaída.

Es importante remarcar que las pruebas serológicas pueden generar tanto resultados falsos-positivos como falsos-negativos por lo que siempre tienen que correlacionarse con otras pruebas diagnósticas.

1.8 TRATAMIENTO

El tratamiento de elección es la amfotericina B. La dosis administrada es similar a la empleada en otras micosis sistémicas: 0.6 mg/kg/día sin pasar de 3 gr como dosis total, administrada con solución glucosada por vía intravenosa. La importancia de éste fármaco es que atraviesa la barrera meníngea, lo cual no se realiza adecuadamente con algunos derivados de los azoles como el ketonazol y el itraconazol, salvo el fluconazol que ha demostrado mejor efectividad, administrándose a la dosis de 200-400 mg diarios por vía oral.

La 5-fluorocitosina (5-FC) es un agente antifúngico que presenta buenos efectos contra *C. neoformans*. Presenta cierta eficacia en el tratamiento de meningitis criptococal: Este fármaco puede ser administrado oralmente, es relativamente no-tóxico por lo que provoca pocos efectos secundarios. Lamentablemente su efecto terapéutico parece ser inferior al obtenido con la amfotericina B. En pocos casos se desarrolla resistencia durante el tratamiento con 5-FC, lo que no ocurre con la amfotericina B.

Una mayor eficacia en los resultados se obtiene al combinar el tratamiento usando amfotericina B y 5-fluorocitosina, en cuyo caso la dosis sugerida es de 0.35 mg/kg/día de amfotericina B, y 150 mg/kg/día de 5-FC por vía oral. (61) (70).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se desconocen datos que indiquen la frecuencia de aislamientos de especies de *Cryptococcus* de importancia médica en materia fecal de aves de zoológico que pueden representar una fuente de infección importante para el humano y los animales.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

*Conocer la frecuencia de aislamientos de *Cryptococcus neoformans* y de otras especies de *Cryptococcus* de importancia médica a partir de materia fecal de aves de zoológico.

*Valorar la patogenicidad de las cepas aisladas.

*Determinar la importancia epidemiológica de los aislamientos y considerar su potencialidad como fuentes de infección.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

*Comparar la frecuencia de aislamientos de las especies de *Cryptococcus* patógenas y no patógenas en relación a las especies de aves estudiadas.

*Evaluar la patogenicidad en animales de experimentación de las cepas aisladas en comparación con cepas testigo.

*Comprobar la eficacia de los métodos utilizados en la identificación de diversas especies de *Cryptococcus*.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

4.1.1 Procedencia

Se colectaron 266 muestras de materia fecal provenientes de 38 especies de aves del Parque Zoológico "San Juan de Aragón" de la Ciudad de México, pertenecientes a los órdenes falconiformes, anseriformes, psitaciformes, galliformes, pisciformes, columbiformes y gruiformes. El estudio se realizó tomando 7 muestras de cada especie de ave. Anexo 8.1.

4.1.2 Colecta

En cada una de las jaulas (aviarios), se procedió primero a averiguar si había una o más especies de aves. Si en la jaula se encontraba solamente una especie de ave, la muestra de materia fecal se colectaba directamente. Cuando en la jaula había más de una especie de ave, se esperó a que el ave defecara, o bien, se procedió a la identificación de la materia fecal con la ayuda del personal del zoológico.

La toma de la muestra de materia fecal se realizó con la ayuda de un hisopo o espátula limpia, dependiendo de la consistencia de la misma, y se depositó en un frasco estéril de boca ancha, se etiquetó con el nombre común del ave. Las muestras se transportaron al laboratorio para ser procesadas inmediatamente.

4.1.3 Procesamiento de las muestras

De cada una de las muestras se tomó un gramo de materia fecal, el cual fue suspendido bajo condiciones asépticas en nueve mililitros (ml) de solución salina isotónica (0.85%). A partir de ésta suspensión 1:10, se prepararon las diluciones seriadas 1:100, 1:1000, y 1:10 000. Se homogeneizaron y se dejaron 15 minutos en reposo. De la interfase de cada dilución se tomaron 0.5 ml y se sembraron en el medio de agar creatinina-*Guizotia abyssinica* (Medio de niger). Anexo 8.2 .

Las siembras se dejaron incubar a 26°C durante 15 días, con dos períodos de observación: El primero a los 7 días y el segundo a los 15 días para posterior identificación de las colonias levaduriformes.

4.2 PURIFICACION DE LAS CEPAS

Todas las cepas sospechosas de corresponder a *Cryptococcus* sp. previa identificación macroscópica y microscópica de las colonias, se sembraron en el medio de agar dextrosa de Sabouraud (SDA) para su purificación. Anexo 8.2.

Para la purificación de las colonias muy contaminadas, se realizó lo siguiente: A partir de el(los) primocultivo(s) o retrocultivo(s), se preparó una suspensión ajustada al tubo N° 1 (3×10^8 cels/ml) del nefelómetro de McFarland del cual se prepararon las diluciones seriadas 1:100, 1:1000, y 1:10 000

para sembrarlas en SDA hasta obtener una colonia purificada. En casos de severa contaminación se utilizó el medio de SDA adicionado con difenil y cloranfenicol.

4.3 IDENTIFICACION

A partir de las cepas aisladas se realizaron las siguientes pruebas de identificación:

4.3.1 IDENTIFICACION MACROSCOPICA Y MICROSCOPICA

4.3.1.1 Presencia de pigmento café en el medio de agar-creatinina *Guizotia abyssinica* (Medio de níger).

Se procedió a la observación macroscópica de las colonias levaduriformes para su identificación. Las colonias con pigmento café se consideraron como *C. neoformans*. Las colonias con escaso pigmento o nula pigmentación y cápsula se consideraron como *Cryptococcus* sp. Se consideró el aspecto de la colonia (mucoide, brillante, lisa, convexa, etc.).

Tanto las colonias que presentaron una pigmentación café así como las colonias con escasa o nula pigmentación y cápsula fueron purificadas para efectuar su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas, crecimiento a 37°C y patogenicidad en ratón.

4.3.1.2 Presencia de cápsula (Tinción negativa con tinta china)

La identificación microscópica de las colonias se efectuó bajo la prueba micológica consistente en realizar examen en fresco con tinta china.

El examen en fresco consistió en tomar una gota de tinta china diluida en agua destilada en una proporción 1:1 y agregar a una pequeña asada de cada una de las colonias levaduriformes identificadas anteriormente en el medio de niger. Posteriormente se observó al microscopio para demostrar la presencia de levaduras capsuladas.

4.3.2 PRUEBAS BIOQUIMICAS Y FISIOLÓGICAS

4.3.2.1 Hidrólisis de urea (Producción de ureasas)

Para la realización de ésta prueba se utilizó el medio de agar urea de Christensen. Anexo 8.2.

A partir de colonias jóvenes con 2 ó 3 días de maduración en el medio de SDA, se tomó una asada de la colonia (o inoculación con una suspensión ajustada al tubo N24 de la escala de McFarland: 12×10^6 cels/ml), la cual se sembró directamente en el medio de urea en tubos por duplicado, y se mantuvo a 26-27°C.

El medio de urea contiene rojo fenol el cual es indicador de la reacción alcalina en presencia de ureasas. Como

consecuencia de la hidrólisis de la urea se produce amoniaco. La prueba se da como positiva si el medio vira de una coloración amarilla inicial a rosa. La lectura se realizó al tercer día.

4.3.2.2 Crecimiento en presencia de cicloheximida

Para comprobar la sensibilidad a la cicloheximida, se utilizó el medio de Sabouraud adicionado con antibióticos (S.A.). Anexo 8.2.

A partir de colonias jóvenes con 2 ó 3 días de crecimiento se sembró una asada en tubos por duplicado, en el medio de S.A. Después de 3 a 7 días se observó si las colonias presentaron o no crecimiento.

Las especies de *Cryptococcus* son inhibidas por la cicloheximida por lo que en el medio de S.A. no se observa crecimiento de las colonias.

4.3.2.3 Crecimiento a 37°C

Esta prueba se realizó para determinar si las cepas aisladas eran capaces de presentar termotolerancia y por lo tanto crecer a 37°C y ser patógenas.

A partir de colonias con 2 ó 3 días de maduración, se tomó una asada, la cual fue sembrada en el medio de SDA por duplicado. Posteriormente se colocaron en una estufa sometiendo

a cada una de las cepas aisladas a crecer a 37°C. Después de un período de 3 a 7 días se observó si las cepas presentaron o no crecimiento. El crecimiento se registró en escaso (+), moderado (++) , y abundante (+++).

4.3.2.4 Asimilación de fuentes de carbono.

Método de Wickerham (auxanograma).

Todas las cepas que presentaron positividad en las pruebas de hidrólisis de urea, presencia de cápsula y sensibilidad a la cicloheximida (Cepas caracterizadas como *Cryptococcus* sp.) y además presencia de pigmento café o escasa pigmentación, con o sin la habilidad para crecer a 37°C (cepas caracterizadas como *C. neoformans* o como probables especies de *Cryptococcus* de importancia médica), se sometieron a las pruebas de asimilación de azúcares mediante el método de Wickerham. Anexo 8.2.

4.3.2.4.1 Preparación del inóculo

A partir de colonias puras de 2 ó 3 días de crecimiento se preparó una suspensión ajustada al tubo NQ1 del nefelómetro de McFarland (3×10^8 cels/ml).

4.3.2.4.2 Siembra en tubos de Wickerham

Se tomó 0.2 ml de la suspensión anterior y se pipeteó en cada uno de los tubos (por duplicado) que contenían los

siguientes carbohidratos: sacarosa, dextrosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa, trihalosa, xilosa, melibiosa, eritritol e inositol.

Como testigo negativo se utilizó un medio que contenía únicamente el extracto de levadura. Además se utilizaron cepas testigo (positivos y negativos) de la micoteca de referencia.

La prueba se consideró como positiva si se observaba una turbidez mayor a la del tubo testigo negativo.

4.3.3 PATOGENICIDAD EXPERIMENTAL EN RATON

4.3.3.1 Preparación del inóculo

Todas las cepas de *Cryptococcus* sp., se sembraron en SDA, y a partir de colonias con 2 ó 3 días de maduración se preparó el inóculo.

De cada una de las colonias se preparó una suspensión ajustada al tubo N21 del nefelómetro de McFarland, utilizando como vehículo agua destilada estéril. La concentración fue de 3×10^8 cels/ml.

4.3.3.2 Inoculación experimental

De cada una de las cepas de *Cryptococcus* se inocularon dos ratones machos de la cepa Taconic con un peso de 25-30 gramos al iniciar el experimento. Los ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal aplicando una dosis de 0.5 ml. de la

suspensión. Para la inoculación intraperitoneal se utilizó una jeringa de 1 ml (insulina) con una aguja de 27 x 13 mm.

La inoculación intraperitoneal se realizó tomando la piel detrás de las orejas y cuello del ratón, sosteniendo la cola con el dedo anular y con el dedo meñique la pata derecha. Se limpia la zona a inocular con una torunda impregnada con alcohol. La inyección se aplica en la ingle derecha del ratón teniendo como precaución no perforar las vísceras, para lo cual se inclina un poco el cuerpo del animal (para "cargar" los órganos al lado contrario al cual se va a inocular).

Los animales inoculados se marcaron para su identificación y se colocaron en jaulas con grupos de ocho anotando la fecha y el número de la cepa. Se mantuvieron en observación durante 30 días. A los animales que murieron durante de éste período se les realizó necropsia. Después de este tiempo los ratones sobrevivientes fueron sacrificados.

Los testigos positivos fueron los ratones inoculados con *C. neoformans*, *C. laurentii*, y *C. albidus* procedentes de la micoteca.

4.3.3.3 Registro de datos

Una vez sacrificados los ratones, se les practicó laparotomía exploratoria para observar daño a nivel macroscópico: masas gelatinosas, aumento de volumen de la caja

craneana, coloración y puntos blancos en órganos, etc.

Posteriormente se extirparon: cerebro, pulmón, hígado y bazo. Los órganos se colocaron en cajas de petri estériles y se les agregó un poco de solución salina isotónica (0.85%) para evitar la desecación de los mismos. Cada uno de los órganos se dividió en dos partes: una se utilizó para realizar exámen en fresco con tinta china, y para los subcultivos; la otra se colocó en frascos con formol al 10% adicionado con fosfatos.

Para realizar el exámen en fresco con tinta china se efectuó lo siguiente: En un mortero estéril se colocó la mitad del órgano a observar, se maceró para obtener el homogeneizado, al cual se le agregó solución salina isotónica al 0.85%. A partir de ésta suspensión se tomó una gota y se colocó en un portaobjetos, se agregó una gota de tinta china, posteriormente se revisó la preparación para demostrar la presencia de levaduras capsuladas.

4.3.3.4 Subcultivos

Los subcultivos se hicieron a partir de la solución de homogeneizado de cada uno de los órganos, de los cuales se tomó 0.2 ml para ser sembrados en SDA, y se incubaron a 26°C durante 15 días. Finalmente, fueron revisados y reconocidos mediante exámen directo y observación macroscópica de las colonias levaduriformes.

4.3.4 PRUEBAS COMPROBATORIAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACION DE ESPECIES DE *Cryptococcus*.

Además de la identificación de las cepas por las pruebas anteriormente citadas, se realizaron las siguientes pruebas comprobatorias, con la finalidad de confirmar la identidad de las cepas aisladas:

4.3.4.1 Producción de pseudomicelio

A partir de colonias con 2 ó 3 días de maduración se tomó una asada y se sembró directamente en el medio de agar harina de maíz adicionado con tween 80 (Anexo 8.2). Después de 72 horas se realizó el examen directo de las colonias con azul de algodón. Las especies de *Cryptococcus* son incapaces de desarrollar micelio o pseudomicelio y cuando éste último se desarrolla es muy rudimentario.

4.3.4.2 Formación de tubo germinal

Una pequeña asada de las colonias levaduriformes con 2 ó 3 días de maduración fue suspendida en suero humano y sometida durante 2 horas a 37°C. Después de éste tiempo se realizó el examen directo en busca de tubos germinales. Las especies de *Cryptococcus* no desarrollan tubo germinal.

4.3.4.3 Pigmentación en agar malta

Las colonias de *Cryptococcus* con 2 ó 3 días de maduración se sembraron en el medio de agar malta para observar los patrones de pigmentación de algunas especies. Este criterio fue útil sobre todo para la identificación de especies que no mostraron crecimiento a 37°C y no presentaron patogenicidad en ratón, además de su identificación por pruebas de asimilación de carbohidratos.

Al realizar cada una de las pruebas de identificación se utilizaron tanto testigos positivos como negativos procedentes de la micoteca del Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Las cepas testigo fueron las siguientes:

Cryptococcus neoformans (serotipos A, B, C, y D).

Cryptococcus laurentii

Cryptococcus albidus

Candida albicans

Rhodotorula sp.

Torulopsis glabrata

5. RESULTADOS

5.1 AISLAMIENTO

De un total de 266 muestras obtenidas a partir de materia fecal de 38 especies de aves (7 muestras por especie), en 82 muestras (30.83%), se aislaron colonias de *Cryptococcus*, de las cuales el 6.40% corresponde a *Cryptococcus neoformans*, 5.64% a *Cryptococcus albidus*, 3.76% a *Cryptococcus laurentii*, y el restante 15.03% a *Cryptococcus* sp.

En las muestras de materia fecal pertenecientes a aves de los órdenes falconiformes (cóndor de los Andes, cara cara, halcón cola roja, halcón Harry's, zopilote rey, águila real, cernícalo y azor), anseriformes (pato pekín y ganso común), y strigiformes (lechuza de campanario) no se logró aislar a ninguna especie de *Cryptococcus*.

El mayor porcentaje de aislamientos de *C. neoformans* (3.01%), se realizó en galliformes (faisán chino de collar, chachalaca, hoco faisán, faisán dorado y pavo real), seguido por psitaciformes en un 1.88% (periquito australiano, perico frente naranja, guacamaya verde y guacamaya roja), columbiformes en un 1.13% (paloma común, paloma alas blancas) y passeriformes en un 0.38% (gorrión común).

C. albidus se aisló en un 3.38% a partir de psitaciformes (perico frente naranja, guacamaya roja, cotorra cuchá, guacamaya verde y periquito australiano), y en un 1.88% en

TABLA 9

FRECUENCIA RELATIVA DE AISLAMIENTOS DE *Cryptococcus* spp. EN 266 MUESTRAS DE MATERIA FECAL EN RELACION A LOS DIFERENTES ORDENES DE AVES

ORDEN	NR DE MUESTRAS EXAMINADAS	FRECUENCIA RELATIVA				TOTAL
		<i>C. neoformans</i>	<i>C. albidus</i> (%)	<i>C. laurentii</i>	<i>Cryptococcus</i> spp	
FALCONIFORMES	56	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ANSERIFORMES	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
STRIGIFORMES	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PISCIFORMES	14	0.0	0.0	0.38	0.38	0.76
GALLIFORMES	63	3.01	1.88	1.5	5.26	11.65
PSITACIFORMES	63	1.88	3.38	1.5	5.26	12.02
PASERIFORMES	21	0.38	0.38	0.0	0.75	1.51
COLUMBIFORMES	21	1.13	0.0	0.0	1.5	2.63
GRUIFORMES	7	0.0	0.0	0.38	1.88	2.26
TOTAL	266	6.4	5.64	3.76	15.03	30.83

galliformes (hoco faisán, chachalaca y faisán plateado), además de passeriformes en un 0.38% (azulejo de San Blás).

C. laurentii se aisló con igual frecuencia (1.50%) de galliformes (pavo real, faisán plateado y hoco faisán) y psitaciformes (periquito australiano y guacamaya roja) seguido por pisciformes (tucaneta verde) y gruiformes (gallina de agua) en un 0.38% respectivamente.

La Tabla 9 indica la frecuencia de aislamientos de éstas tres especies en relación a los diferentes órdenes de aves.

Otras especies de *Cryptococcus* se aislaron a partir de materia fecal de galliformes (codorniz común, gallina de Guinea, pavo real, hoco faisán, gallo de Bankiva y faisán chino de collar), y psitaciformes (periquito australiano, cotorra amapola, cotorra montañesa y guacamaya verde) principalmente.

La frecuencia de aislamientos de *C. neoformans*, *C. albidus*, y *C. laurentii* en relación a las diversas especies de aves se indica en las Tablas 10, 11 y 12 respectivamente, en donde se puede notar que *C. neoformans* predomina en paloma común, faisán dorado, hoco faisán, faisán chino de collar y periquito australiano. *C. albidus* en hoco faisán, perico frente naranja, guacamaya roja, cotorra cuchá y guacamaya verde. Y *C. laurentii* predomina en periquito australiano, guacamaya roja y pavo real.

La microbiota que se encontró asociada a *C. neoformans*, *C.*

TABLA 10

FRECUENCIA RELATIVA DE AISLAMIENTOS DE
Cryptococcus neoformans EN DIVERSAS
ESPECIES DE AVES DE ZOOLOGICO

ESPECIE	Nº DE MUESTRAS EXAMINADAS	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
Gorrión común <i>Passer domesticus</i>	7	1	14.28
Paloma alas blancas <i>Zenaida asiatica</i>	7	1	14.28
Paloma común <i>Columba livia</i>	7	2	28.57
Faisán dorado <i>Chrysolophus pictus</i>	7	2	28.57
Pavo real <i>Pavo cristatus</i>	7	1	14.28
Hoco faisán <i>Crax rubra</i>	7	2	28.57
Chachalaca <i>Oryzopsis poliocephala</i>	7	1	14.28
Faisán chino de collar <i>Phasianus colchicus</i>	7	2	28.57
Periquito australiano <i>Melospitacus undulatus</i>	7	2	28.57
Perico frente naranja <i>Aratinga canicularis</i>	7	1	14.28
Guacamaya verde <i>Ara militaris</i>	7	1	14.28
Guacamaya roja <i>Ara macao</i>	7	1	14.28
Otras especies	182	0	0
TOTAL	266	17	6.40

TABLA 11

FRECUENCIA RELATIVA DE AISLAMIENTOS DE
Cryptococcus albidus EN DIVERSAS
ESPECIES DE AVES DE ZOOLOGICO

ESPECIE	Nº DE MUESTRAS EXAMINADAS	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
Perico frente naranja <i>Aratinga canicularis</i>	7	2	28.57
Periquito australiano <i>Melopsitacus undulatus</i>	7	1	14.28
Guacamaya roja <i>Ara macao</i>	7	2	28.57
Cotorra cucha <i>Amazona autumnalis</i>	7	2	28.57
Guacamaya verde <i>Ara militaris</i>	7	2	28.57
Azulejo de San Blas <i>Cissilopha samblasiana</i>	7	1	14.28
Hoco faisán <i>Crax rubra</i>	7	3	42.85
Chachalaca <i>Ortalis poliocephala</i>	7	1	14.28
Faisán plateado <i>Lophura nycthemera</i>	7	1	14.28
Otras especies	203	0	0.0
TOTAL	266	15	5.64

TABLA 12

FRECUENCIA RELATIVA DE AISLAMIENTOS DE
Cryptococcus laurentii EN DIVERSAS
ESPECIES DE AVES DE ZOOLOGICO

ESPECIE	Nº DE MUESTRAS EXAMINADAS	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
Periquito australiano <i>Melopsitacus undulatus</i>	7	2	28.57
Guacamaya roja <i>Ara macao</i>	7	2	28.57
Pavo real <i>Pavo cristatus</i>	7	2	28.57
Faisán plateado <i>Lophura nycthemera</i>	7	1	14.28
Hoco faisán <i>Crax rubra</i>	7	1	14.28
Gallina de agua <i>Porphyrio martinica</i>	7	1	14.28
Tucaneta verde <i>Aulacorhynchus prasinus</i>	7	1	14.28
Otras especies	217	0	0.0
TOTAL	266	10	3.76

albidus, *C. laurentii* y *Cryptococcus* sp. en las 266 muestras de materia fecal, se presenta en la Tabla 13. Se encontró la persistencia de hongos contaminantes, en mayor proporción Mucorales (56.01%), deuteromicetes como *Penicillium* sp (46.24%), *Aspergillus* sp (16.16%), *Fusarium* sp (14.28%), *Cladosporium* sp (15.41%) y *Alternaria* sp (13.53%), así como levaduras blancas (63.15%) y *Rhodotorula* sp (32.33%). Esta micobiota se aisló principalmente en las siembras efectuadas con la suspensión 1:10 y la dilución 1:100.

5.2 PURIFICACION

El proceso para separar las colonias levaduriformes sospechosas de corresponder a especies de *Cryptococcus* de hongos y bacterias contaminantes presentó efectividad en 82 cepas, por los procedimientos indicados en material y método, sin embargo, la persistencia de contaminantes y el pequeño tamaño de algunas colonias levaduriformes impidieron la purificación en 8 cepas (3.0%), pertenecientes a codorniz, gallina de Guinea, faisán chino de collar, hoco faisán, gallina de agua y guacamaya verde. No obstante, una pigmentación típica marrón y la presencia de levaduras capsuladas indicó que pertenecían muy probablemente a *C. neoformans* aunque éstas no fueron tomadas en cuenta para la tabulación de resultados.

TABLA 13

FRECUENCIA DE MICOBIOTA ASOCIADA A
Cryptococcus spp EN 266 MUESTRAS
DE MATERIA FECAL DE AVES DE ZOOLOGICO

GRUPO FUNGICO	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS	FRECUENCIA RELATIVA (%)
Mucorales	149	56.01
<i>Penicillium</i> sp	123	46.24
<i>Aspergillus</i> sp	43	16.16
<i>Fusarium</i> sp	38	14.28
<i>Alternaria</i> sp	36	13.53
<i>Cladosporium</i> sp	41	15.41
<i>Cephalosporium</i> sp	8	3.00
<i>Geotrichum</i> sp	8	3.00
<i>Scopulariopsis</i> sp	4	1.50
<i>Verticillium</i> sp	2	0.75
<i>Streptothrix</i> sp	2	0.75
<i>Monocillium</i> sp	3	1.13
<i>Stachybotrys</i> sp	1	0.38
<i>Gliocladium</i> sp	1	0.38
Micelio estéril	77	28.94
Levaduras blancas	168	63.15
Levaduras pigmentadas	59	22.18
Levaduras negras	10	3.75
<i>Rhodotorula</i> sp	86	32.33

5.3 IDENTIFICACION

5.3.1 Identificación macroscópica y microscópica. pruebas bioquímicas y fisiológicas

La producción de pigmento en los primoaislamientos utilizando el medio de agar-creatinina *Guizotia abyssinica* (medio de niger), se caracterizó por mostrar diversos patrones de pigmentación con tonalidades café oscuro, café tenue a beige. Por lo tanto, las colonias con una típica pigmentación café o marrón se consideraron como *C. neoformans* y las colonias con una escasa o nula pigmentación y cápsula como *Cryptococcus* sp. Las colonias presentaron un aspecto mucóide o semimucóide, con apariencia lisa, convexa y con bordes regulares.

C. neoformans fue identificada en 11 cepas en los primoaislamientos. Y las cepas que presentaron una pigmentación inferior a la café oscuro o marrón fueron resebradas en este mismo medio. Al repetir la resiembra en el medio de niger, la intensidad en la pigmentación de las colonias se conservó o bien varió ligeramente, lo que llevó a suponer que algunas eran tentativas de corresponder a ésta especie. Algunas cepas de *C. albidus* y *C. laurentii* mostraron una escasa pigmentación. Tabla 14.

En el medio de SDA las colonias de *C. neoformans*, así como de otras especies de *Cryptococcus* con tres días de maduración exhibieron una coloración cremosa a ligeramente amarillenta y

ocasionalmente rosada, con apariencia lisa, ligeramente convexa, con bordes regulares y en algunas ocasiones poco mucoides. El aspecto mucoso de las colonias se incrementó en 5-8 días de crecimiento.

El tamaño de las cápsulas fue variable, pero en general, en el primoaislamiento se presentó como un halo escaso a mediano. En algunas ocasiones se observaron cápsulas bien desarrolladas (15-17 micras).

La forma de las levaduras observadas mostraron células redondas en su mayoría y en ocasiones ligeramente ovaladas.

Los datos obtenidos en las principales pruebas bioquímicas y fisiológicas efectuadas en este trabajo para la identificación de especies de *Cryptococcus*, indican lo siguiente:

1) En la prueba de hidrólisis de urea, la reacción positiva se observó entre las 48 y 72 horas, denotada por el cambio de coloración inicial del medio de Christensen a rosa. Tabla 14.

2) Ninguna de las cepas presentó crecimiento en el medio adicionado con cicloheximida (S.A.) después de 3-7 días de incubación a 26°C, lo que implica que tales cepas mostraron sensibilidad a dicho antibiótico. Tabla 14.

3) Treinta y seis cepas (43.9%) identificadas posteriormente como *C. neoformans*, *C. albidus*, y *C. laurentii*

mostraron crecimiento a 37°C. El crecimiento en 31 colonias a ésta temperatura se exhibió de escaso a moderado. Únicamente 5 cepas de *C. neoformans* presentaron crecimiento relativamente abundante cuando se sometieron a ésta temperatura. Tabla 14.

4) En lo que respecta a las pruebas de asimilación de fuentes de carbono, se observó que las especies identificadas tuvieron básicamente un patrón bioquímico similar al descrito en la Tabla 5. El principal criterio para la identificación del género *Cryptococcus* fue basado en demostrar la asimilación de inositol. Ochenta y dos cepas aisladas fueron inositol positivo. Para caracterizar a nivel de especie se tomó en consideración la asimilación de otros carbohidratos, principalmente lactosa y galactosa.

Diecisiete (20.73%) de las ochenta y dos cepas se determinaron como *C. neoformans* ya que asimilaron sacarosa, dextrosa, galactosa (débilmente), maltosa, rafinosa, xilosa, trialosa, pero no lactosa.

El 18.29% (15 cepas) se caracterizó por presentar variaciones en la asimilación de galactosa, lo que condujo a la determinación bioquímica de *C. albidus*. Se observaron 2 patrones diferentes: a) Diez cepas (12.19%) que presentaron tanto galactosa como lactosa negativos y b) Cinco cepas (6.09%) en las que hubo tanto galactosa positiva como negativa aún tratándose de la misma especie. Las 15 cepas asimilaron

TABLA 14
PRUEBAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS
DETERMINANTES EN LA IDENTIFICACION
DE ESPECIES DE *Cryptococcus*

PRUEBA	<i>Cryptococcus neoforans</i> (17 cepas)	<i>Cryptococcus albidus</i> (15 cepas)	<i>Cryptococcus laurentii</i> (10 cepas)	<i>Cryptococcus</i> sp (40 cepas)
Presencia de pigmento	!! (6) !!! (11)	- (4) ! (9) !! (2)	! (6) !! (4)	- (40)
Presencia de cápsula	+ (17)	+ (15)	+ (10)	+ (40)
Hidrólisis de urea	+ (17)	+ (15)	+ (10)	+ (40)
Sensibilidad a cicloheximida	+ (17)	+ (15)	+ (10)	+ (40)
Crecimiento a 37°C	+ (8) ++ (4) +++ (5)	+ (3) ++ (10) - (2)	+ (3) ++ (3) - (4)	- (40)

Presencia de pigmento: (-) no se observa pigmentado; (!) colonia beige; (!!) colonia marrón tenue; (!!!) colonia marrón oscuro.

Cápsula: (+) presencia de cápsula.

Hidrólisis de urea: (+) producción de ureasas.

Sensibilidad a cicloheximida: (+) no se observa crecimiento.

Crecimiento a 37°C: (-) sin crecimiento; (+) escaso; (++) moderado; (+++) abundante.

sacarosa, dextrosa, maltosa, rafinosa, trialosa y xilosa.

C. laurentii presentó asimilación de sacarosa, dextrosa, galactosa, maltosa, rafinosa, trialosa, xilosa y una fuerte asimilación de lactosa, por lo que el 12.19% de las cepas (10 cepas) correspondieron al patrón exhibido por ésta especie.

Cuarenta cepas se identificaron como *Cryptococcus* sp., por no presentar crecimiento a 37°C y patogenicidad en ratón, además de la ausencia de pigmento en el medio de niger. Únicamente 12 de éstas cepas se pudieron identificar tentativamente como *C. infirmominiatus*, *C. laurentii* var. *magnus*, *C. laurentii* var. *flavescens*, *C. ater*, *C. flavus*, *C. skinneri* y *C. uniguttulatus*. En el resto de las cepas no se lograron las resiembras, motivo que impidió realizar las respectivas pruebas de asimilación de carbohidratos para su identificación.

5.3.2 Patogenicidad experimental en ratón

A la observación clínica la mayoría de los animales inoculados intraperitonealmente, no mostraron síntomas y signos aparentes de la enfermedad. Únicamente cinco ratones mostraron ligero aumento del diámetro craneal y erizamiento de pelo.

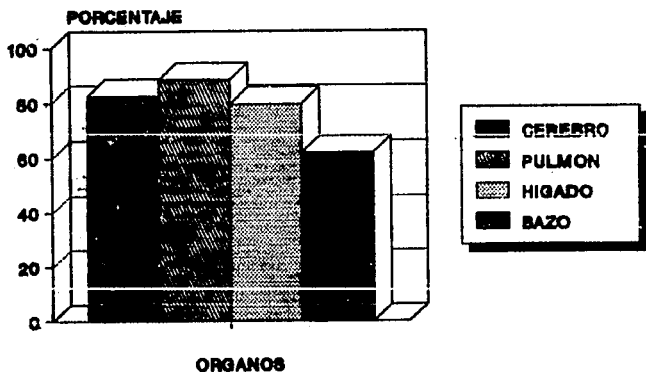
Por medio de la autopsia se observó que en 143 animales el aspecto macroscópico de los órganos fue normal. En 21 animales se observó hepato y esplenomegalia.

En los animales que murieron antes del período de observación no se presentaron alteraciones macroscópicas y microscópicas en las necropsias, por lo que se atribuye la muerte a causas ajenas a la infección criptocócica.

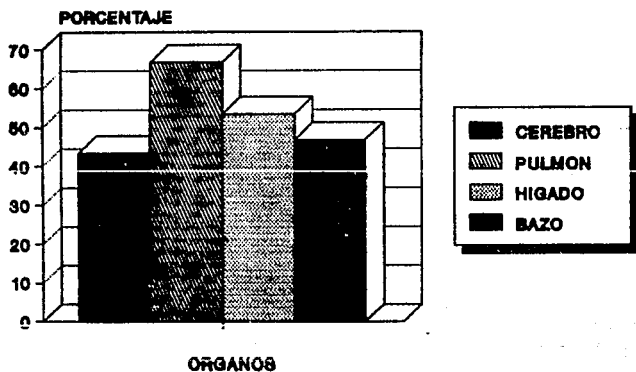
De un total de 82 cepas de *Cryptococcus* spp inoculadas, en el 51.2% (42 cepas) se observaron células capsuladas en cerebro, pulmón, hígado y bazo. En éstas mismas 42 cepas patógenas para ratón, las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas fueron correlativas ya sea a *C. neoformans* (17 cepas), *C. albidus* (15 cepas) o a *C. laurentii* (10 cepas). Y en el 48.8% (40 cepas) no se presentó ninguna sospecha de patogenicidad por lo que se clasificaron como *Cryptococcus* sp., ya que tampoco dichas pruebas correlacionaron con especies patógenas, únicamente se reconocieron como *Cryptococcus* por las características morfológicas macroscópicas y microscópicas.

En las Gráficas 1, 2 y 3 se indica el porcentaje de órganos afectados en relación a cada una de las especies de *Cryptococcus* inoculadas intraperitonealmente. Las 42 cepas identificadas como *C. neoformans*, *C. albidus* y *C. laurentii*, presentaron células levaduriformes capsuladas al exámen directo con tinta china a partir de los órganos indicados anteriormente. La frecuencia de órganos afectados dependiendo de las especies de *Cryptococcus* fue variable. Comparativamente, la mayor afección se observó con *C. neoformans*, los órganos más

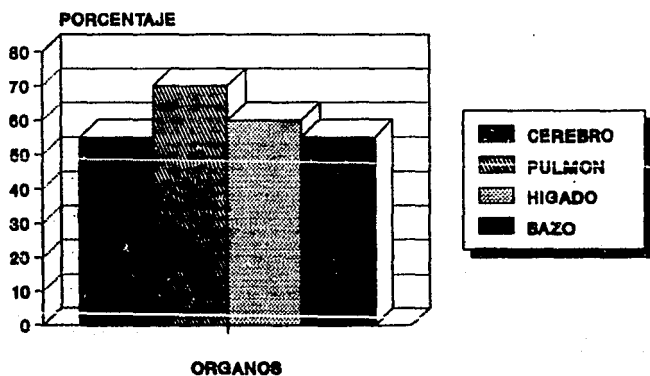
GRAFICA 1
ORGANOS AFECTADOS POR *C. neoformans*
(INOCULACION INTRAPERITONEAL)



GRAFICA 2
ORGANOS AFECTADOS POR *C. albidus*
(INOCULACION INTRAPERITONEAL)



GRAFICA 3
ORGANOS AFECTADOS POR *C. laurentii*
(INOCULACION INTRAPERITONEAL)



afectados con ésta especie fueron pulmón y cerebro seguida de hígado y bazo. Para *C. albidus* y *C. laurentii* la mayor afección se presentó también en pulmón, pero seguido de hígado, bazo y cerebro.

El tamaño de la cápsula se incrementó con la inoculación intraperitoneal. En general, el diámetro de las levaduras capsuladas presentó un rango de 15 a 20 micras en pulmón y cerebro, superior al observado en hígado y bazo que fue de 12 a 15 micras. La cantidad de levaduras examinadas microscópicamente en los órganos de animales inoculados con *C. neoformans* fue superior respecto a las encontradas con *C. albidus* y *C. laurentii*.

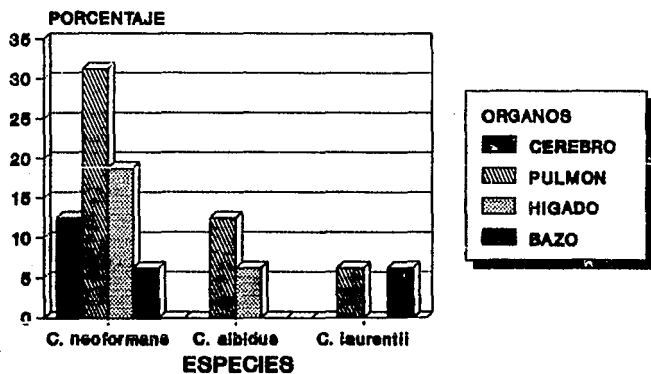
5.3.2.1 Subcultivos

De un total de 336 subcultivos (un subcultivo por cada órgano de ratón) efectuados a partir de homogeneizados de cerebro, pulmón, hígado y bazo de animales inoculados intraperitonealmente con *C. neoformans*, *C. albidus* y *C. laurentii*, el 4.76% (16 subcultivos) fueron positivos. Estos subcultivos correspondieron a 14 animales.

La frecuencia de subcultivos positivos en relación a cada uno de los órganos examinados se indica en la Gráfica 4.

Para *C. neoformans* 11 subcultivos (68.75%) fueron positivos, de los cuales, el 31.25% (cinco subcultivos)

GRAFICA 4
SUBCULTIVOS POSITIVOS DE *C. neoformans*
C. albidus* y *C. laurentii



correspondieron a pulmón, seguido de un 18.75% (tres subcultivos) en hígado, un 12.5% (dos subcultivos) en cerebro y un 6.25% (un subcultivo) en bazo.

C. albidus se obtuvo de tres subcultivos (18.75%) de los cuales, dos subcultivos (12.5%) provenían de pulmón y un subcultivo (6.25%) de hígado. Y para *C. laurentii* se obtuvieron dos subcultivos, uno de pulmón (6.25%) y uno de bazo (6.25%). No se lograron subcultivos a partir de cerebro.

5.3.3 Pruebas comprobatorias utilizadas en la identificación de especies de *Cryptococcus*

Otras pruebas efectuadas en el presente estudio (presencia de pseudomicelio, producción de tubo germinal y presencia de pigmento en agar malta) se realizaron únicamente para confirmar la identidad de las cepas aisladas. En estas pruebas se observó lo siguiente:

- 1) Ninguna de las cepas de *C. neoformans*, *C. albidus*, *C. laurentii* y *Cryptococcus* sp., produjeron tubo germinal.
- 2) Únicamente dos cepas de *Cryptococcus* sp presentaron un pseudomicelio muy rudimentario en agar harina de maíz.
- 3) La pigmentación presentada por las colonias de *Cryptococcus* spp en el medio de agar malta fue poco determinante particularmente en la identificación de algunas especies no patógenas, la mayoría generaron colonias hialinas

en este medio. Microscopicamente se observaron levaduras gemando y ocasionalmente blastoconidios alargados.

6. DISCUSION

En estudios realizados sobre la recuperación de *C. neoformans*, *C. albidus* y *C. laurentii* se ha demostrado una considerable frecuencia de aislamientos a partir de materia fecal de diversas especies de aves, particularmente palomas (columbiformes) y periquitos australianos, pericos, loros, etc. (psitaciformes).

En el presente estudio se informa sobre el aislamiento de especies del género *Cryptococcus*. *C. neoformans* se aisló en 17 (6.40%) de 266 muestras de materia fecal de diferentes aves pertenecientes a los órdenes psitaciformes, columbiformes, galliformes y passeriformes. La frecuencia aquí obtenida y las especies de las cuales se recuperó la levadura concuerdan con los datos encontrados por otros autores: Gugnani et al. (26) encontraron una frecuencia del 14.7% en 102 muestras de nidos, jaulas y sitios inhabitados por palomas y de un 7.7% de 39 muestras de suelo. Bauwens (5) indica el aislamiento a partir de 13 diferentes especies de aves. Y por último Staib (75) observó que de cada cuatro aves positivas, tres eran pericos. Y recientemente en otro comunicado Staib y Heibenhuber (77) informaron del aislamiento de la levadura en un 5.78% de 294 muestras de diferentes especies de aves en las que predominan los psitaciformes y consideraron que no se encontraron diferencias significativas con la frecuencia encontrada en

1962. Respecto a las especies de aves indicadas en estos trabajos y comparando con el presente trabajo tenemos que algunos géneros y especies coinciden: *Melopsitacus undulatus* (periquito australiano), *Ara militaris* (guacamaya verde), *Columba livia* (paloma), cotorras pertenecientes al género *Aratinga* y pericos pertenecientes al género *Amazona*, así como algunas especies de faisanes como *Phasianus colchicus* (Faisán chino de collar) y *Lophura nycthemera* (faisán plateado).

El aislamiento de otras especies de importancia médica en particular *C. albidus* y *C. laurentii* de esta fuente natural ha sido poco estudiada, debido probablemente a que son patógenas ocasionales de la criptococosis en el hombre. Sin embargo, existen algunos registros como los de Bangert et al. (3) y Gallo et al. (22) que indican su aislamiento a partir de materia fecal de palomas y de psitaciformes. En el presente estudio, se encontró una considerable frecuencia en su aislamiento y se encontró que la principal fuente lo constituyen las especies de aves pertenecientes a los órdenes psitaciformes, columbiformes y galliformes. *C. albidus* se aisló en 15 (5.64%) y *C. laurentii* en 10 (3.76%) de 266 muestras.

Se considera que la frecuencia encontrada en los aislamientos de *C. neoformans*, *C. laurentii* y *C. albidus* podría indicar la amplia distribución de éstas especies en la naturaleza.

Al parecer, es constante el hecho de que *Cryptococcus* sólo se presente en ciertos órdenes de aves, un aspecto interesante es esa "selección" de habitat para su desarrollo. La distribución en la naturaleza de las especies de *Cryptococcus* en particular de *C. neoformans* se debe a diversos factores como son: el pH de la materia fecal, así como la concentración de ácido urico y creatinina en las mismas. Hubalek (64) determinó que la composición química de las excretas son un factor primario que influye en la distribución de *C. neoformans*. Por lo tanto la distribución de otras especies de *Cryptococcus* en la naturaleza puede estar influenciada por condiciones similares.

El medio de agar creatinina *Guizotia abyssinica* utilizado en el primoaislamiento de las colonias mostró gran utilidad en la diferenciación entre las especies de *Cryptococcus* de otras levaduras. Sin embargo, en algunas colonias de este género no se observaron diferencias en la pigmentación. *C. neoformans* fue identificada en once cepas en el primoaislamiento a través de las pruebas morfológicas y de pigmentación y seis fueron corroboradas por pruebas de asimilación de carbohidratos. Algunas colonias de *C. albidus* y *C. laurentii* exhibieron una ligera pigmentación, la cual no fue distintiva de *C. neoformans*. Esta observación parece estar de acuerdo con las realizadas por Chaskes y Tyndall (15), Salkin et al. (68), en

la que se hace notar que éstas especies ocasionalmente pueden producir pigmento a partir de precursores de fenoles presentes en el medio de níger.

Las pruebas de asimilación de carbohidratos fueron útiles en la diferenciación de *C. neoformans*, *C. albidus* y *C. laurentii* particularmente en aquellas cepas que no mostraron diferencias en la pigmentación de las colonias y crecimiento a 37°C.

Por otro lado, la habilidad de diversas especies del género para crecer a 37°C fue un criterio útil para diferenciar cepas patógenas de las no patógenas pero no para distinguir a algunas cepas de *C. neoformans* de *C. albidus* y *C. laurentii*. Las cepas identificadas por su termotolerancia también mostraron la capacidad a producir cápsulas en condiciones experimentales por inoculación intraperitoneal en ratones. Y a diferencia de éstas, otras especies de *Cryptococcus* no demostraron crecer a 30°C y 37°C y por consiguiente no produjeron cápsulas bajo las mismas condiciones. *C. neoformans* causó una mayor afección que *C. albidus* y *C. laurentii*, aun cuando al tratarse de cepas de origen saprobio, todas éstas mostraron una débil patogenicidad a ratón.

La infección criptocócica fue demostrada por la obtención de subcultivos, especialmente los obtenidos de homogeneizados de órganos de animales inoculados con *C.*

neoformans. Los subcultivos obtenidos de *C. albidus* y *C. laurentii* fueron sumamente escasos. No obstante al exámen de los órganos en fresco se observaron levaduras con cápsulas bien desarrolladas que no se demostró con *Cryptococcus* sp.

Es importante considerar que otras especies de *Cryptococcus* diferentes de *C. neoformans* pueden producir infección bajo ciertas condiciones. De Bernardis et al. (16) observaron que el estado inmunológico del hospedero es importante para que se establezca la infección por otras especies del género.

En México, es justificable continuar con estudios sobre el aislamiento de *Cryptococcus neoformans*, principal agente causal de la criptococosis, así como *C. albidus* y *C. laurentii*, en materia fecal de aves y otras fuentes naturales y definir el papel de las aves en la distribución de este hongo en la naturaleza, así como realizar un estudio epidemiológico más exhaustivo que integre datos sobre la frecuencia en el aislamiento de especies de *Cryptococcus* de importancia médica y la prevalencia e incidencia de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

En base a los datos obtenidos en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

1. La materia fecal de las aves constituye una fuente natural importante para el aislamiento no solamente de *C. neoformans* que es el principal agente causal de la criptococosis, sino de otras especies de *Cryptococcus*, incluyendo tanto patógenos ocasionales como *C. albidus* y *C. laurentii* como especies no patógenas.
2. La composición química de la materia fecal puede estar determinando la distribución de las especies de *Cryptococcus* en ciertos órdenes de aves.
3. El medio de agar-creatinina-*Guizotia abyssinica*, al menos en el presente estudio, fue poco selectivo para diferenciar a *C. neoformans* de algunas especies de *C. laurentii* principalmente y de *C. albidus*, debido a que las dos últimas presentaron una ligera pigmentación inclusive en los primoaislamientos.
4. La habilidad para crecer a 37°C no fue una característica distintiva entre *C. neoformans*, *C. albidus* y *C. laurentii* ya que las tres exhibieron termotolerancia, aun cuando el crecimiento fue de escaso a moderado, lo cual indica que éstas especies pueden ser consideradas como patógenas.
5. En las pruebas de patogenicidad se demostró la presencia

de levaduras capsuladas en mayor o menor grado tanto en animales inoculados con *C. neoformans* como animales inoculados con *C. albidus* y *C. laurentii*, lo que demuestra la variable potencialidad de las cepas como patógenas.

6. Desde el punto de vista epidemiológico, se puede decir, que la materia fecal constituye una fuente de infección importante para el hombre y los animales para la adquisición de la criptococosis. Existe una posible implicación en la salud pública, el contacto con psitaciformes y columbiformes principalmente, representa un riesgo para las personas que manejan a éstas aves en los zoológicos y sobre todo para grupos susceptibles de padecer la enfermedad como los inmunodeprimidos (principalmente los pacientes con SIDA), con enfermedades debilitantes y en corticoterapia.

8. ANEXOS

ANEXO 8.1

Nombres comunes y científicos de las especies de aves muestreadas.

CLASE AVES

ORDEN FALCONIFORMES

Cara cara	<i>Polyborus plancus</i>
Cóndor de los Andes	<i>Vultur gryphus</i>
Halcón Harry's	<i>Parabuteo unicinctus</i>
Halcón cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>
Zopilote rey	<i>Sarcoramphus papa</i>
Aguila real	<i>Aquila chrysaetos</i>
Cernicalo	<i>Falco sparverius</i>
Azor	<i>Spizaetos ornatus</i>

ORDEN PSITACIFORMES

Cotorra amapola	<i>Amazona viridiginalis</i>
Guacamaya serrana	<i>Rhynchopsitta pachyrhyncha</i>
Guacamaya verde	<i>Ara militaris</i>
Guacamaya roja	<i>Ara macao</i>
Perico frente naranja	<i>Aratinga canicularis</i>
Periquito australiano	<i>Melopsitacus undulatus</i>

Cotorra montañesa

Amazona finschi

Cotorra cucha

Amazona autumnalis

Perico verde

Aratinga holochlora

ORDEN GALLIFORMES

Faisán plateado

Lophura nycthemera

Faisán dorado

Chrysolophus pictus

Faisán chino de collar

Phasianus colchicus

Hoco faisán

Crax rubra

Gallo de Bankiva

Gallus gallus

Codorniz común

Colinus virginianus

Gallina de Guinea

Numida meleagris

Pavo real

Pavo cristatus

Chachalaca

Ortalis poliocephala

ORDEN PASERIFORMES

Cuervo común

Corvus corax

Azulejo de San Blás

Cissilopha sanblasiana

Gorrión común

Passer domesticus

ORDEN COLUMBIFORMES

Paloma común

Columba livia

Paloma de collar

Columba fasciata

Paloma alas blancas

Zenaida asiática

ORDEN STRIGIFORMES

Lechuza de campanario

Tyto alba

ORDEN PISCIFORMES

Tucán

Rhamphastos sulfuratus

Tucaneta verde

Aulacorhynchus prasiannus

ORDEN ANSERIFORMES

Pato pekín

Anas sp

Ganso común

Chilophaga leucoptera

ORDEN GRUIFORMES

Gallina de agua

Porphyryla martinica

ANEXO 8.2

Medios de cultivo

8.2.1 Agar creatinina- *Guizotia abyssinica* (Medio de niger, medio de Staib).

<i>Guizotia abyssinica</i>	50 gr
Dextrosa	1 gr
KH_2PO_4	1 gr
Creatinina	1 gr
Agar (Bioxon)	15 gr
Cloranfenicol	50 mg
Difenil	100 mg
Agua destilada	1000 ml

- Pulverizar la semilla con la ayuda de un mezclador eléctrico.
- Adicionar el agua destilada y hervir por 30 minutos.
- Filtrar con gaza, obtener el extracto de la semilla y aforar a 1000 ml.
- Adicionar los demás ingredientes.
- Esterilizar a 121°C ó 15 Lb de presión durante 15 minutos.

- Enfriar a una temperatura aproximada de 50°C
- Adicionar el cloranfenicol y difenil disueltos en etanol.
- Dispersar en cajas de petri en condiciones asepticas
- pH final : 6.5

8.2.2 Agar dextrosa de Sabouraud (SDA)

Sabouraud dextrosa agar (Bioxon)	65 gr
Agua destilada	1000 ml

- Suspender el agar dextrosa de Sabouraud en el agua destilada, mezclar hasta obtener una suspensión uniforme.
- Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto, hasta disolver completamente.
- Dispersar en tubos con tapón de algodón.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada.
- pH final: 5.6 ± 0.2

8.2.3 Agar urea de Christensen

Base de urea (Difco)	29 gr
Agua destilada	100 ml

- Disolver la base de urea en agua destilada.
- Esterilizar por filtración milipore.

Preparar por separado:

Agar bacteriológico (Bioxon)	15 gr
Agua destilada	900 ml

- Suspender el agar en agua destilada. hervir hasta disolver.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Enfriar a 50°C

Combinar ingredientes:

- Adicionar la base de urea al agar y mezclar bajo condiciones asépticas.
- Dispersar en tubos estériles alícuotas de 2 ml
- Enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada.
- pH final: 6.9

8.2.4 Agar micobiótico (Sabouraud antibióticos: S.A.)

Agar adicionado con cicloheximida y cloranfenicol

Agar micobiótico (Bioxon)	36 gr
Agua destilada	1000 ml

- Suspender el agar microbiótico en el agua destilada y mezclar.
- Cuando la suspensión sea uniforme, calentar con agitación frecuente y hervir hasta disolver completamente.
- Distribuir en tubos con tapón de algodón.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada.
- pH final: 6.9

8.2.5 Medio basal para la asimilación de carbohidratos
(tubos de Wickerham para auxanograma)

Extracto de levadura (Difco)	0.67 gr
Agua desionizada	100 ml
Carbohidrato	0.50 gr

Preparación del extracto de levadura (yeasts nitrog base):

- Suspender el extracto de levadura en 30 ml de agua desionizada. Mezclar y disolver completamente.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente.

Preparación de la solución del carbohidrato:

- Suspender el carbohidrato de elección (sacarosa,

dextrosa, maltosa, galactosa, lactosa, xilosa, rafinosa, trialosa, inositol, etc.) en 20 ml de agua desionizada.

-Esterilizar por filtración milipore.

Combinar la solución del carbohidrato elegido con la base nitrogenada o extracto de levadura:

-Adicionar los 20 ml de la solución del carbohidrato esterilizado en 80 ml del extracto de levadura previamente enfriado.

-Dispersar alícuotas de 2 ml en tubos estériles bajo condiciones asépticas.

-Concentración final del carbohidrato: 0.5%

Concentración final del extracto de levadura: 0.67%

-pH final : 5.6

8.2.6 Agar harina de maíz

Agar harina de maíz (Difco)	17 gr
Agua destilada	1000 ml
Tween 80	10 ml

-Suspender el agar harina de maíz en el agua destilada y mezclar.

- Calentar y hervir con agitación frecuente hasta disolver completamente.
- Retirar y adicionar el tween 80 y mezclar.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Dispersar en cajas de petri bajo condiciones asépticas.
- Solidificar a temperatura ambiente
- pH final: 6.0

8.2.7 Agar con extracto de malta

Agar extracto de malta (Bioxon)	33.6 gr
Agua destilada	1000 ml

- Suspender el agar en el agua destilada.
- Disolver calentando, hervir durante un minuto.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Dispersar en cajas de petri bajo condiciones asépticas.
- Solidificar a temperatura ambiente.
- pH final : 4.6 ± 0.2

9. BIBLIOGRAFIA

1. Abou-Gabal M. and M. Atia. 1978. Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. Sabouraudia 16:63-68.
2. Alexopoulos C.J. and C.W. Mims. 1979. Introductory Mycology. 3th. John Wiley and Sons, Inc. New York, U.S.A. 525-528; 555-557.
3. Bangert R.L., B.R. Cho., P.R. Widders., E.H. Stauber and A.C. Ward. 1988. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. Avian Dis 32:46-52.
4. Bastide J.M. et M. Mollie. 1986. Ultrastructure et biologie de *Cryptococcus neoformans*. Bull Soc Fr Mycol Med XV, N21:11-20.
5. Bauwens L. 1986. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. Mykosen 29:291-294.
6. Bennet J.E., K.J. Kwon-Chung and D.H. Howard. 1977. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus*

- neoformans*. Am. J. Epidemiol. 105:552-586.
7. Bergman F. 1963. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in Sweden. Acta Médica Scandinavica 174:651-655.
 8. Bonifaz A. 1990. Micología Médica Básica, 1ª ed. Ed. Fco Méndez Cervantes. México. 305-317.
 9. Bowman P.I. and D.G. Ahearn. 1978. Ecology of *Cryptococcus neoformans* in Georgia. In: Proceedings of the IV International Conference on the Mycoses. PAHO. Scientific Publication N2 356:258-268. Washington D.C.
 10. Bunting L.A., J.B. Neilson and G.S. Bulmer. 1979. *Cryptococcus neoformans*: Gastronomic delight of soil ameba. Sabouraudia 17:225-232.
 11. Campbell M.C. and J.L. Stewart. 1960. The Medical mycology Handbook. U.S.A. 98-111; 180-181; 265-267; 370-375.
 12. Cano-Domínguez, C., C. Villareal., J.L. Estrada., G. Gómez. y F. Ramírez. 1989. Infección por *Cryptococcus neoformans* en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Aspectos clínicos, paraclínicos y terapéuticos.

México. Rev. Med. IMSS 27:175-179.

13. Castañón-Olivares, L.R. and R. López-Martínez. 1989. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon excrement in México City. First International Conference on Cryptococcus-Cryptococcosis. Jerusalem, Israel. Abstracts 313: 296-297.
14. Chandler F.W. and R.M. Selik. 1989. Epidemiology of AIDS and its opportunistic infections. 3rd Symposium Topic in Mycology: Mycoses in AIDS patients. The Pasteur Institute. Paris, France. 29-32.
15. Chaskes S. and R. Tyndall. 1978. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. J. Clin. Microbiol. 7:146-152.
16. De Bernardis F., E. Palliola., R. Lorenzini and G. Antonucci. 1987. Evaluation of the experimental pathogenicity of some *Cryptococcus* species in normal and cyclophosphamide immunodepressed mice. Microbiol. Immunol. 31:449-460.

17. Drouhet E. and B. Dupont. 1989. Mycoses in AIDS patients an overview. 3rd Symposium Topics in Mycology: Mycoses in AIDS patients. The Pasteur Institute, Paris, France. 36-38.
18. Drouhet E., B. Dupont et G. Reyes. 1986. Antigenes de *Cryptococcus neoformans* et réponse immunologique dans la cryptococcose, mycose d' actualite et mycose de l' avenir. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. XV, No1:21-30.
19. Ellis, D.H. 1987. *Cryptococcus neoformans* var. *gatii* in Australia. J. Clin. Microbiol. 25:430-431.
20. Emmons, C. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with pigeon (*Columba livia*). Am. J. Hyg. 62:227-232.
21. Ensley P. K., C.E. Davis., M.P. Anderson and K.C. Fletcher. 1979. Cryptococcosis in a male Beccari's crowned pigeon. J. Am. Vet. Med. Assoc. 175:992-994.
22. Gallo M.G., P. Cabeli and V. Vidotto. 1989. Presence of pathogenic yeasts in the feces of the semi-domesticated pigeon (*Columba livia*, Gmelin 1789, urban type) from the

city of Turin. Parassitologia 31:207-212.

23. Garza G.D., E. Martínez., A. Ruíz., T. Guillén e I. Ruíz. 1991. Estudio morfológico y fisiológico de 31 cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con SIDA. Memorias IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala, México. p.43.
24. Gluck J.L., J.P. Myers and L.M. Pass. 1987. Cryptococemia due to *Cryptococcus albidus*. S. Med. J. 80:511-513.
25. Greer D.L. 1978. Cryptococcosis in Colombia: Epidemiological and clinical aspects. In: Proceedings of the IV International Conference on the Mycoses. PAHO. Scientific Publication Nº 356:185-194. Washington D.C.
26. Gugnani H.C., N.P. Gupta and J.B. Shrivastav. 1972. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in Delhi Zoological Park and its recovery from sputum of an employee. Ind. J. Med. Res. 60:182-185.
27. Guiguen C., M.T. Boisseau-Lebrueil et B. Couprie. 1986. Flore fongique du tube digestif isolée de pigeons de ville à Bordeaux. Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd. XV, Nº1:151-154.

28. Hernández-Gómez, M.R. 1988. Biotipificación de cepas de *Filobasidiella (Cryptococcus) neoformans* y *gatii* aislados a partir de casos clínicos humanos. Tesis de Licenciatura. QFB. FES Cuautitlán, UNAM.
29. Hermoso de Mendoza S.M., A. Miranda., J.A. Perea., A. Arenas., J.B. Poveda., J. Carranza y L. Leon. 1987. Criptococosis en paloma I. Frecuencia de portadores en buche en el área urbana de Córdoba. Revista Ibérica de Micología 4:121-127.
30. Hermoso de Mendoza S.M., A. Miranda., J.A. Perea., A. Arenas., J.B. Poveda., J. Carranza y L. Leon. 1987. Criptococosis en paloma II. Tipificación bioquímica y serológica de las cepas aisladas. Revista Ibérica de Micología 4:128-134.
31. Herrera T. y M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. 1ªed. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. 51-66; 181-182.
32. Junkerman F.P. and M.R. Schwartzman. 1977. Micología Médica Veterinaria. 1ªed. CECSA. México. 169-173.

33. Kagaya K., T. Yamada., Y. Miyakawa., Y. Fukazawa and S. Saito. 1985. Characterization of pathogenic constituents of *Cryptococcus neoformans* strains. Microbiol. Immunol. 29:517-532.
34. Kaufman L. and S. Blumer. 1978. Cryptococcosis: the awakening giant. In: Proceedings of the IV International Conference on the Mycoses. PAHO. Scientific Publication No 356:176-182. Washington D.C.
35. Kovacs J.A., A.A. Kovacs., M. Polis., W. Craig., V.J. Gill., C.U. Tuazon., E.P. Gelmann., H. Clifford., R. Longfield., G. Overturf., A.M. Macher., A.S. Fauci., J.E. Parrillo., J.E. Bennet and H. Masur. 1985. Cryptococcosis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Annals of Internal Medicine 103:533-538.
36. Krumholz R.A. 1972. Pulmonary cryptococcosis. A case due to *Cryptococcus albidus*. Am. Rev. Res. Dis. 105:421-424.
37. Kwon-Chung K.J., I. Polachek and J.E. Bennet. 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A y D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gatii* (serotypes B y C). J.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Clin. Microbiol. 15:535-537.

38. Kwon-Chung K.J. and T. J. Popkin. 1976. Ultrastructure of septal complex in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). J. Bact. 126:524-528.
39. Kwon-Chung K.J. and A. Varma. 1989. *Cryptococcus neoformans*-Ecology and Epidemiology. 3rd Symposium Topic in Mycology: Mycoses in AIDS patients. The Pasteur Institute, Paris, France. 55-56.
40. Lin S.R., C.F. Peng., S.A. Yang and H.S. Yu. 1989. Isolation of *Cryptococcus albidus* var. *albidus* in patient with pemphigus foliaceus. Kao-Hsiung-I-Hsuch-Ko-Huch-Tsa-Chih 5:126-128.
41. Loaiza L.S. 1988. Criptococosis. Infectología N28:387-395.
42. Lodder J. 1971. *Cryptococcus*. In: The Yeasts, A Taxonomic study. 5ed. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, London. 1088-1145.
43. López-Martínez R. and L.R. Castañón-Olivares. 1989. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from Natural Sources.

First International Conference on Cryptococcus-
Cryptococcosis. Jerusalem, Israel. 313:297.

44. Madeira-Lopes A., M.T. Placido and C. Cabeca-Silva. 1986. Comparative study of the temperature profiles of growth and death of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* and the non-pathogenic *Cryptococcus albidus*. J. Basic. Microbiol. 26:43-47.
45. Madewell B.R., C.A. Holmberg and N.A. Ackerman. 1979. Lymphosarcoma and cryptococcosis in a cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 175:65-68.
46. McGinnis M.R. 1980. Laboratory Handbook of Medical Mycology. Academic Press Inc. New York, U.S.A. 337-410.
47. Medleau L., E.J. Hall., M.H. Goldschmidt and N. Irby. 1985. Cutaneous cryptococcosis in three cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 187:169-170.
48. Melo J.C., S. Srinivasan., M.L. Scott and M.J. Raff. 1980. *Cryptococcus albidus* meningitis. J. Infect. 2:79-82.
49. Min K.H. and K.J. Kwon-Chung. 1986. The biochemical basis

for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. Zbl. Bakt. Hyg. A. 261:471-480.

50. Mocan H., A.V. Murphy., T.J. Beattie and T.A. McAllister. 1989. Fungal peritonitis in children on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Scott Med. J. 34:494-496.
51. Montero G.F. and F. Alvarado. 1978. Clinical and Epidemiological aspects of cryptococcosis in Costa Rica. In: Proceedings of the IV International Conference on the Mycoses. PAHO. Scientific Publication NQ356:195-198. Washington D.C.
52. Mujici'c H. 1987. Cryptococcosis of the Central Nervous System. Three casuistics. Mycosen 30:419-424.
53. Müller J. 1989. Immunological aspects of cryptococcosis in AIDS patients. 3rd Symposium Topic in Mycology: Mycoses in AIDS patients. The Pasteur Institute, Paris, France. 59-59''.
54. Pal M., Z.U. Khan and H.S. Randhawa. 1979. Observations on niger seed creatinine agar as a selective medium for

- Cryptococcus neoformans*. Ind. J. Microbiol. 19:19-22.
55. Pal M. and B.S. Mehrotra. 1985. Studies on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruits and vegetables. Mykosen 28:200-205.
56. Paliwal D.K., H.S. Randhawa and T. Kowshik. 1979. A modified method for testing inositol assimilation by *Cryptococcus* species. Can. J. Microbiol. 25:1188-1190.
57. Queiroz L.A., A. Purchio., C.R. Paula and W. Gambale. 1978. Assimilation of carbon sources by *Cryptococcus neoformans*. In: Proceeding of the IV International Conference on the Mycoses. PAHO. Scientific Publication NQ356:237-245. Washington D.C.
58. Randhawa H.S., Y. Cleyton and R. Riddel. 1965. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon habitats in London. Nature London 208:801.
59. Refal M., M. Taha., S.A. Selin., F. Elshabourii and H. Yousseff. 1983. Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other yeasts from pigeon droppings in Egypt. Sabouraudia 21:163-165.

60. Rendón-Rojas M.C.J. 1986. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de paloma y gallina. Tesis de Licenciatura. QFB. FES Cuautitlán. UNAM.
61. Rippon J.W. 1988. Medical Mycology. 3th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, E.U.A. 532-536; 582-609.
62. Rose A.H. and H.S. Harrison. 1987. The Yeasts. 2th ed. Academic Press. London. Great Britain. 5-61; 239-242.
63. Roussilhon C., J.M. Postal and P. Ravisse. 1987. Spontaneous cryptococcosis of a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) in French Guyana. J. Med. Primatol. 16:39-47.
64. Ruiz A., J.B. Neilson and G.S. Bulmer. 1982. Control of *Cryptococcus neoformans* in nature by biotic factors. Sabouraudia 20:21-29.
65. Ruiz A., J.B. Neilson and G.S. Bulmer. 1982. A one year study on the viability of *Cryptococcus neoformans* in nature. Mycopathologia 77:117-122.
66. Sabetta J.R. and V.T. Andriole. 1985. Cryptococcal infection of the central nervous system. Med. Clin. North-

Am. 69:333-344.

67. Salfelder K. 1978. Pathology of cryptococcosis, candidiasis and torulopsis. In: Proceedings of the IV International Conference on the Mycoses. PAHO. Scientific Publication NQ356:214-217.
68. Saikin I.F., M.R. McGinnis and G.A. Land. 1989. Evaluation of selective rapid procedures for the identification of *Cryptococcus neoformans* in the clinical laboratory. First International Conference on Cryptococcus-Cryptococcosis. Jerusalem, Israel. 313:294.
69. Schmeding K.A., S.C. Jong and R. Hugh. 1984. Biochemical variation of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia 84:121-131.
70. Scholer H.J. 1985. Diagnosis of cryptococcosis and monitoring of chemotherapy. Mykosen 28:5-16.
71. Shadomy H.J., S. Wood-Helie., S. Shadomy., W.E. Dismukes., R.Y. Chau and the NIAID. Mycoses study group. 1987. Biochemical serogrouping of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.

6:131-138.

72. Shields A.B. and L. Ajello. 1966. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Science 151:208-209.
73. Sinnott J.T., J. Rodniti., P.J. Emmanuel and A. Campos. 1989. *Cryptococcus laurentii* infection complicating peritoneal dialysis. Pediatric. Infect. Dis. J. 8:803-805.
74. Staib F. 1961. *Cryptococcus neoformans* beim kanarienvogel. Erste. Abt. Orig. Bd. 185:129-134.
75. Staib F. 1985. Sampling and isolation of *Cryptococcus neoformans* from indoor air with the aid of the reuter centrifugal sampler (RCS) and *Guizotia abyssinica* creatinine agar. A contribution to the mycological-epidemiological control of *C. neoformans* in the fecal matter of caged birds. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B. 180:567-575.
76. Staib F. 1987. Cryptococcosis in AIDS. Mycological-diagnostic and epidemiological observations. AIDS-Forschung (AIFO) 2:363-382.

77. Staib F. and M. Heibenhuber. 1989. *Cryptococcus neoformans* in bird droppings: A hygienic-epidemiological challenge. AIDS-Forschung (AIFO) 12:649-655.
78. Staib F. and H.P.R. Seeliger. 1966. Un nouveau milieu pour l'isolement de *Cryptococcus neoformans* des matières fécales et du sol. Annales de l'Institut Pasteur, Paris, France. 110:792-793.
79. Staib F., M. Seibold., M. L'age., W. Heise., J. Skörde., G. Grosse., F. Nürnberger and G. Bauer. 1989. *Cryptococcus neoformans* in the seminal fluid of an AIDS patient. A contribution to the clinical course of cryptococcosis. Mycoses 32:171-180.
80. Swinne-Desgain D. 1975. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. Sabouraudia 13:303-308.
81. Swinne-Desgain D. 1979. *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 59:285-299.
82. Swinne-Desgain D. et Ch DeVroey. 1987. Epidemiologie de la cryptococcose. Revista Ibérica de Micología 4:77-83.

83. Vandepitte J.M. 1989. Clinical aspects of cryptococcosis in AIDS patients. 3rd Symposium Topics in Mycology: Mycoses in AIDS patients. The Pasteur Institute, Paris, France. 57-58.
84. Vergara Takahashi L. 1990. Criptococosis. Análisis epidemiológico y diagnóstico. Tesis de especialidad en dermatología. Facultad de Medicina. UNAM.