



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGIA

**AISLAMIENTO DE *Cryptococcus neoformans*
A PARTIR DE EXCREMENTOS DE PALOMA
(*Columba livia*) EN LA ZONA
NORTE DE LA CIUDAD DE MEXICO**

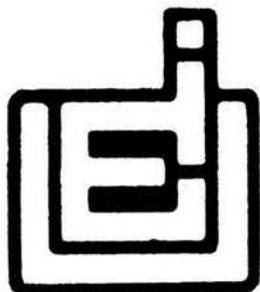
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

MARIA DEL SOCORRO RUEDAS VELAZQUEZ



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rubén López-Martínez.

A Dios

Porque me ha dado las fuerzas e iluminado el camino
para seguir adelante.

A la Memoria de mi abuelita Josefa Ruedas.

A mis padres Antonio y Altagracia

Porque se que este trabajo representa mucho para ellos.

Por los sacrificios que ambos realizaron para que yo pudiera darles ésta
satisfacción.

Gracias por haber merecido siempre su confianza, por sentirme orgullosa de
ustedes.

A mis hermanas Bertha y Eva

Porque a pesar de todas las adversidades con esfuerzo propio
y realización constante, han logrado lo que se han propuesto.

Por su ayuda, amor y amistad que ha habido entre nosotras.

A mis Amigos y Compañeros

Porque cada uno a su manera han estado cerca de mi.

Porque juntos aprendimos la belleza de la Ciencia y la grandeza del Universo,
aún cuando en el desempeño de la vida hayamos escogido caminos diferentes.

AGRADECIMIENTOS

Con mucho respeto:

A los sinodales Biol. Ma. Guadalupe Oliva, M. en C. Agustín Ruíz, Dr. Rubén López, Q.F.B. Gloria Paniagua y Biol. Graciela Molina por las observaciones y sugerencias hechas para la realización de este trabajo.

A mi coasesora Biol. Laura Rocio Castañón, a los maestros M. en C. Agustín Ruíz y M. en C. Patricia Manzano porque revisaron amablemente muchos de los manuscritos de esta tesis, aportando numerosas sugerencias que mejoraron de forma y de fondo esta tesis.

Al M. en C. Luis Javier Méndez y a Angeles Carmona por su ayuda para la mejor presentación de los dibujos de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Micología Médica, particularmente a Francisca Hernández, Claudia Ríos y Rafael Rojas quienes siempre me animaron y dieron su apoyo incondicional.

A la Dra. Josefina Torres y al Biol. Miguel Castillo porque a su lado me inicié en este gusto por los hongos.

El Dr. Ruben López por su asesoramiento y dirección y ante todo por sus observaciones, apoyo, paciencia y confianza depositadas en mí desde el principio ya que fueron determinantes para la realización de la presente.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION Y GENERALIDADES	3
ANTECEDENTES	7
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y METODO	16
RESULTADOS	22
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	44
ANEXO	46
BIBLIOGRAFIA	49

RESUMEN

Se estudiaron 202 muestras de excremento de paloma *Columba livia* a partir de 39 sitios diferentes del Norte de la Ciudad de México y algunas localidades adyacentes.

En una primera fase se comparó la eficacia de 3 medios de cultivo diferentes que inducen pigmento sobre las colonias de *Cryptococcus neoformans*: Agar *Guizotia abyssinica* simple (AGA), Agar *Guizotia abyssinica* más Violeta de Metilo (AGA+VM), y el Agar Azul Tripiano (AAT). Los medios más adecuados en esta primera fase resultaron ser el Agar *Guizotia abyssinica* y el Agar *Guizotia abyssinica* más Violeta de Metilo.

En una segunda fase se compararon estos dos medios para el aislamiento de *C. neoformans* a partir de 202 muestras de excremento de paloma. El medio más adecuado fué el AGA+VM, y el medio AGA permitió una mejor recuperación de las colonias levaduriformes.

De las 44 muestras que en el primoaislamiento presentaron morfología macro y microscópica correspondientes a *C. neoformans*, solamente 18 presentaron crecimiento a 37°C e hidrólisis de urea. Siete cepas no presentaron la morfología inicial típica de *C. neoformans* pero al ser resembradas y probadas con urea y crecimiento a 37°C, fueron positivas. Estas 7 cepas más 12 cepas con crecimiento típico fueron inoculadas en ratones por vía intraperitoneal; en todas ellas se produjeron lesiones, dando el 95 % de las cepas una localización cerebral.

De los 4 tipos de sitios estudiados (iglesias, casa con palomares, edificios y parques), las iglesias presentaron mayor número de muestras positivas a *Cryptococcus neoformans*.

Por todo lo anterior se considera que los excrementos de paloma son una fuente importante de contaminación en el medio ambiente, para *C. neoformans*, por lo que se sugieren algunas medidas para eliminar o controlar las poblaciones de estas aves.

1. INTRODUCCION Y GENERALIDADES

En la vida diaria, el ser humano se encuentra constantemente expuesto a una gran variedad de hongos microscópicos, los cuales pueden encontrarse en el aire, en el suelo, o bien en nuestro organismo como comensales. Esta relación supondría que la posibilidad de que el hombre adquiriera una infección por hongos es alta, y sin embargo sólo aproximadamente 150 de las miles de especies de hongos conocidas, pueden provocar enfermedad en el hombre ó en los animales. (Jawetz, 1983)

Dentro de este grupo de hongos se encuentran los denominados clínicamente como oportunistas, puesto que requieren de la supresión de las defensas del huésped para poder ejercer patogenicidad. Estos hongos han adquirido gran importancia en los últimos años, debido a un aumento de las infecciones que causan. Este aumento se debe sobre todo al empleo frecuente de terapias inmunosupresoras: radiaciones, quimioterapia, corticoesteroides y a la administración constante de antibióticos. Los organismos más frecuentes como causantes de micosis oportunistas son: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae* y *Cryptococcus neoformans*. (Rippon, 1988)

La mayoría de estos microorganismos son saprobios pero con capacidad de adaptación al medio interno del huésped.

En el caso de la criptococosis se ha encontrado que existe una asociación casi constante entre los excrementos de paloma y la presencia del agente etiológico causal, *Cryptococcus*

neoformans. La criptococosis puede presentarse tanto en los animales como en el hombre, quienes adquieren la levadura generalmente por vía respiratoria al inhalar partículas de suelo contaminado, para establecerse en pulmones (Rippon, 1988) y después diseminarse a otras localizaciones del cuerpo, como el sistema nervioso central (SNC), involucrando principalmente meninges (Sabetta y Andriole, 1985), cerebro (Love y col., 1985), el sistema óseo (Poliner, 1979) y la piel (Iacobellis y col., 1979). *C. neoformans* presenta una predilección marcada hacia el SNC, en donde el desenlace de la enfermedad es frecuentemente fatal, o incapacita al individuo. Se ha visto que existe una mayor frecuencia de la enfermedad en pacientes que padecen lupus eritematoso, enfermedad de Hodgkin, leucemia, desnutrición severa, diabetes y en los últimos años en pacientes que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), (Bonifaz, 1990; Staib y col., 1987).

La criptococosis ha sido registrada en varias partes del mundo, y México no es la excepción; su agente etiológico *C. neoformans*, es una levadura esférica rodeada por una cápsula de mucopolisacáridos cuyo espesor varía de 3 a 30 μm de diámetro de acuerdo a la variedad de cepa, y al medio en el cual se desarrolla. Durante mucho tiempo sólo se pensó en esta levadura como un organismo perteneciente a la familia Cryptococcaceae de la Subdivisión Deuteromycotina puesto que únicamente se conocía su estado asexual de blastosporas unigermantes, sin embargo, en

1975 y 1976 Kwon Chung demostró un estado perfecto ó sexual por el entrecruzamiento de dos cepas compatibles de *Cryptococcus neoformans* en condiciones especiales. Kwon Chung (1975) denominó a este estado como *Filobasidiella neoformans* de la Subdivision Basidiomycotina (Cuadro 1). Si bien, existen algunos investigadores como Erke (1982), Cohen (1976) y Ellis (1990) quienes afirman que la forma sexual es la causante de la enfermedad,

hasta el momento la mayoría de los investigadores sostienen que la forma asexual es la única responsable de la criptococosis.

C. neoformans (Sanfelice) Vuillemin 1901, es una levadura redonda, capsulada, aerobia, que se reproduce mediante la formación de una sola yema que emerge de su propia superficie y frecuentemente queda unida a la célula madre por medio de un poro muy estrecho. La cápsula está formada de mucopolisácaridos, cuyo espesor varía de cepa a cepa.

En agar Sabouraud, a temperatura ambiente, las colonias color amarillento son lustrosas y mucoides, dando un aspecto de leche condensada. Crece bien a 37°C, lo que la diferencia de otros *Cryptococcus* saprofitos que no pueden crecer a esta temperatura. Es sensible a cicloheximida (actidiona) (Carrada-Bravo y col., 1974).

Desde el punto de vista bioquímico asimila glucosa, sacarosa, maltosa y galactosa, pero no lactosa ni melobiosa. No es fermentativa. *C. neoformans* puede adquirir nitrógeno de peptona, urea y creatinina, pero no asimila nitrato. Sintetiza

CUADRO 1

CLASIFICACION DE *Cryptococcus neoformans*
(*Filobasidiella neoformans*)

TAXON	EDO. ASEXUAL (ANAMORFICO)	EDO. SEXUAL (TELEMORFICO)
REINO	FUNGI	FUNGI
DIVISION	EUMYCOTA	EUMYCOTA
SUB. DIVISION	DEUTEROMYCOTINA	BASIDIOMYCOTINA
CLASE	BLASTOMYCETES	HETEROBASIDIOMYCETES
ORDEN	CRYPTOCOCCALES	USTILAGINALES
FAMILIA	CRYPTOCOCCACEAE	FILOBASIDACEAE
GENERO	<i>Cryptococcus</i>	<i>Filobasidiella</i>
ESPECIE	<i>neoformans</i>	<i>neoformans</i>
VARIEDAD	. <i>neoformans</i> . <i>gattii</i>	. <i>neoformans</i> . <i>bacillispora</i>

- Clasificación propuesta por Ulloa y Hanlin 1978, la cual se basa en el esquema taxonómico de Ainsworth (1973). (Herrera, T. y Ulloa, H. 1990)

fenoloxidasa la cual produce produce un pigmento tipo "melanina" a partir de fenoles. La hidrólisis de urea y la asimilación de inositol la diferencia de otras levaduras como *Candida albicans*; es además la única especie de su género patógena para el ratón. En el cuadro 2 se anotan las características diferenciales más importantes del género (Koneman, 1983).

Cryptococcus neoformans ha sido encontrado en una gran variedad de sustratos incluyendo áreas rurales en donde no hay palomas, tales como establos, desvanes y paja almacenada (Loaiza, 1988), o bien en la superficie de frutas y vegetales frescos o en descomposición (Pal y col., 1985; López-Martines y col., 1989). Otros sitios de aislamiento son el suelo (Emmons, 1951), la leche, el tracto digestivo de la cucaracha (Swinne y col., 1986), y el excremento de otras aves (Bauwens y col., 1986; Staib, 1985); sin embargo el excremento de la paloma parece ser el sustrato natural óptimo para el desarrollo de esta levadura y por lo tanto, la principal fuente de infección. (Castañón y col., 1989)

A pesar de que *C. neoformans* se aísla principalmente del excremento de la paloma, esta levadura no produce enfermedad en ellas, por lo que se les considera como portadores pasivos; su presencia influye en la distribución y mantenimiento del hongo en la naturaleza. (Hermoso de Mendoza y col., 1987)

**CUADRO 2. CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE *Cryptococcus*,
MAS COMUNMENTE HALLADAS EN MUESTRAS CLINICAS**

<i>Organismo</i>	ASIMILACIONES										FERMENTACIONES					OTRAS REACCIONES								
	GLUCOSA	MALTOSA	SACAROSA	LACTOSA	GALACTOSA	MELIBIOSA	CELOBIOSA	INOSITOL	XILONA	RAFINOSA	TREHALOSA	DULCITOL	GLUCOSA	MALTOSA	SACAROSA	LACTOSA	GALACTOSA	TREHALOSA	UREASA	KNO3	PIGMENTO EN ACAR NIGER	DESARROLLO A 37° C	VIRULENCIA EN RATON	CAPSULA (TINTA CHINA)
<i>C. neoformans</i>	+	+	+	-	++	-	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>C. uniguttulatus</i>	+	+	+	++	+	-	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>C. albidus var. albidus</i>	+	+	+	++	+	+	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>C. laurentii</i>	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>C. luteolus</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>C. albidus var. diffluens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>C. terreus</i>	+	++	-*	-*	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>C. gastricus</i>	+	+	-*	-*	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+

* Variación de cepas en asimilación

+ Positiva

- Negativa

2. ANTECEDENTES

2.1. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans*.

La primera descripción que se tiene sobre el aislamiento del hongo como saprófito fue realizado por Sanfelice a finales del siglo pasado (1895), al referirse al aislamiento de una levadura capsulada a partir de jugo de durazno, la cual causó lesiones en los animales de experimentación (Loaiza, 1988). Pero no fue sino hasta 1951 en que Emmons estableció el hábitat saprobio de *C. neoformans* al aislarlo por primera vez de muestras de suelo y posteriormente del excremento y nidos de palomas en varios edificios de Washington (Emmons, 1960).

La recuperación de *C. neoformans*, principalmente del excremento de la paloma ha sido descrita en varias partes del mundo, por ejemplo: Egipto (Refai y col., 1983), Inglaterra (Randawa y col., 1965), E.U.A. (Littman y col., 1958), Costa Rica (Montero-Gei, 1978), Zaire (Swinne y col., 1986) y Suecia (Bergman, 1963).

Los estudios de Emmons suscitaron una serie de investigaciones sobre el aislamiento y comportamiento del hongo en su hábitat natural ya que muchas de estas investigaciones llevaron a especular que *C. neoformans* era abundante en la naturaleza y podía aislarse fácilmente. Así tenemos que Kao y Schwarz en 1957, describieron el aislamiento de 41 cepas de *Cryptococcus neoformans* en 107 muestras de excremento de paloma (38 %) en 9 sitios de Cincinnati, de los cuales 17 resultaron

letales en animales de experimentación; Littman y Schnerson en 1959, aislaron 72 cepas de 201 muestras (36 %) en 5 condados de la ciudad de Nueva York y las compararon con 20 cepas de origen clínico; ambas presentaron las mismas características biológicas, bioquímicas y patológicas. Por otro lado, Bermang en 1963, realizó un estudio en el sur de Suecia en donde aisló 3 cepas de 450 muestras de palomares domésticos (0.66 %); Randhawa y col. en 1965 en la Ciudad de Londres, aislaron 3 cepas de *C. neoformans* de 49 muestras de excremento de paloma y suelo. Esta variedad de resultados indican que esta levadura no tiene una distribución uniforme y que su frecuencia es variable.

Algunos investigadores tratando de encontrar el porque de esta discrepancia, han estudiado los factores ambientales y a la paloma misma. En 1975, Swinne encontró que al analizar 80 buches de paloma, en 39 se aisló *C. neoformans*, pero éstas no presentaron sintomatología alguna de infección, por tal motivo Swinne propone que este fenómeno podría deberse a la alta temperatura corporal de la paloma (42°C), la cual inhibe la reproducción de la levadura y explica la permanencia en el buche, por períodos cortos de tiempo. Posteriormente, Aboul-Gabal y Atia (1978) encontraron que la levadura no solo permanecía en el buche, sino que ésta pasaba al intestino de la paloma y en este sitio su multiplicación era inhibida por la producción de metabolitos tóxicos de dos enterobacterias: *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*; pero una vez que la materia fecal salía al exterior, el secado rápido suprimía la multiplicación de

las bacterias y permitía la proliferación de *Cryptococcus neoformans*.

Los estudios realizados por Ruiz y col. en 1981 (a) y 1982 (a), refieren que existen dos tipos de factores que influyen en la reproducción y morfología de la levadura y en su distribución en la naturaleza: los factores bióticos y los factores abióticos. Dentro de los factores bióticos están los organismos que presentan una actividad "fungívora" activa, como los trofozoítos de *Acanthamoeba palestinensis* y algunos ácaros y chinches que habitan tanto en los nidos de paloma como el suelo mezclado con excrementos de las mismas. También encontró que la interrelación de los llamados factores abióticos o físicos como la humedad, la temperatura y los nutrimentos, influían directamente en la presencia ó ausencia de *C. neoformans* en el excremento de paloma (Ruiz y col., 1981(a); Ruiz y col., 1982 (b)).

2.2. Importancia Medica.

C. neoformans existe en la naturaleza como un organismo saprobio en el excremento de la paloma y puede causar enfermedad en el hombre. Algunos estudios han demostrado que la criptococosis puede ser adquirida por la inhalación de la levadura, ya que ésta puede diseminarse en la atmósfera, a través de las corrientes de aire (Ruiz y Bulmer, 1981 (b); Neilson y col., 1977). Montero-Gei, F. y Alvarado, F. (1978), demostraron la presencia de *Cryptococcus neoformans* en los palomares de dos de las casas de sus pacientes que presentaron criptococosis y

Carrada-Bravo y col. (1971) aislaron a *C. neoformans* del sitio de trabajo de uno de sus pacientes que falleció por criptococosis.

2.3. Medios de Cultivo.

Si bien se conoce la existencia de *C. neoformans* desde principios de siglo, las primeras investigaciones sobre la elaboración de un medio de cultivo útil para el aislamiento restrictivo del hongo a partir de muestras "contaminadas" del suelo ó deyecciones de la paloma, comenzó en 1966 con los trabajos de dos grupos de investigadores: Shields y Ajello en E.U.A. y Staib y Seelinger en Alemania, ambos elaboraron por separado, un medio de cultivo muy similar con el cual lograron la recuperación diferencial del organismo patógeno a partir de muestras "contaminadas"; este medio contenía entre otros ingredientes el extracto de *Guizotia abyssinica*, una semilla conocida comúnmente como niger y cuyos componentes eran asimilados especialmente por *C. neoformans*, el cual presentaba un color marrón pardo típico, que lo diferenciaba de otras levaduras e inclusive de otras especies de *Cryptococcus*.

El descubrimiento de este medio marcó la pauta para una serie de investigadores que se dieron a la tarea de buscar otros medios selectivos para el hongo y facilitar así su estudio epidemiológico.

En 1974 Vickers y col. desarrollaron un medio de cultivo llamado agar azul tripano. La utilización de este medio permitió la diferenciación de las colonias de *Cryptococcus* de otras

levaduras ya que indujo una pigmentación azul oscuro en las levaduras de este género. Cuando se probó este medio en el laboratorio clínico demostró ser útil para el aislamiento e identificación de levaduras de *Cryptococcus* en dos pacientes con criptococosis.

Algunos medios fueron elaborados con la obtención de compuestos moleculares aislados a partir de la semilla *Guizotia abyssinica* como: el medio de agar esculina de Edberg y col. (1980) y el medio de agar ácido cafeico de Hopfer y Blan (1985). Sin embargo al comparar estos medios de cultivo con el agar de niger de Staib, los resultados obtenidos fueron inferiores, ya que si bien, inducían pigmentación marrón en las colonias de *Cryptococcus*, ésta no era específica, debido a que otras levaduras también se pigmentaban, y por tanto, enmascaraban así la presencia de *C. neoformans* (Stenderup, 1982).

En 1984 Rubio y col. establecieron que cuando se agregaban 2mg/L de violeta de metilo al medio de niger, las colonias de *C. neoformans* intensificaban el color marrón a un color negro, impidiendo de esta manera, el enmascaramiento de esta levadura.

Por último, en 1988 Purchio y col. basados en la actividad fenoloxidasa de *C. neoformans*, elaboraron un medio de cultivo con el extracto de la cáscara del plátano (*Musa paradisiaca*), la cual contiene altas cantidades de dopamina, que es una sustancia fenólica. Ellos encontraron que las colonias de *C. neoformans* desarrollaban una pigmentación marrón oscuro después de 24 horas de incubación a 37°C, en tanto que otras resultaron

negativas.

2.4. *Cryptococcus neoformans* en México.

El conocimiento que se tiene de esta levadura en México está dado básicamente por las publicaciones clínicas de la criptococosis, en varias instituciones de salud, principalmente en la Ciudad de México. El primer caso de criptococosis fue el descrito por González-Ochoa y col. en 1959; posteriormente Carrada-Bravo y col. en 1971 hicieron una recopilación en el Distrito Federal de 25 casos con localización meningocefálica, pulmonar y diseminada. González-Mendoza y López en 1974, describieron un caso de criptococosis generalizada asociada a leucemia granulocítica crónica. Calderón y col., en 1977 publicaron 3 casos de criptococosis meníngea (SNC) en niños. En 1980 Amado-Saul y col. notificaron un caso de un paciente con criptococosis cutánea quien vivió tres años en la Paz, Baja California. En 1987 Vázquez y Anchondo en el Instituto Nacional de Pediatría realizaron una recopilación de 12 casos de niños a quienes se les aisló *Cryptococcus neoformans* del líquido cefalorraquídeo. En 1989 Soriano y Caraco describieron un caso de lupus eritematoso sistémico asociado a criptococosis diseminada mortal. Por último Cano y col. en 1989 en el Centro Médico la Raza, realizaron una recopilación de 23 casos de criptococosis en pacientes con SIDA; estos autores consideran que la criptococosis, podría ser un marcador del síndrome de Inmunodeficiencia adquirida.

En cuanto a las descripciones de *C. neoformans* en la naturaleza son escasas. Carrada-Bravo y col. (1971) además de presentar un caso clínico de criptococosis, realizaron una encuesta epidemiológica en relación con el habitat del microorganismo y lograron el aislamiento de *C. neoformans* a partir del excremento de paloma del sitio de trabajo de su paciente (sacristán de iglesia).

En 1986 Rendon-Rojas realizó la biotipificación de 17 cepas aisladas en 6 iglesias del centro de la Ciudad de México, encontró que 16 de los aislamientos correspondieron a la variedad *neoformans* y sólo uno a la variedad *gattii*. Por otro lado, no aisló levaduras de *C. neoformans* en el excremento de gallina.

En 1988, Castañón-Olivares y col. realizaron un estudio de 249 muestras de materia fecal de paloma, de diferentes sitios públicos de la Ciudad de México, de las cuales, en 44 muestras (17.67%) se aisló *Cryptococcus*.

En 1989 Castañón-Olivares y López-Martínez aislaron la levadura a partir de diversas frutas (toronja, fresa, lima, entre otras) en un 9.45% y de vegetales (remolacha, col, coliflor, tomate y otros) con una frecuencia del 4.33%, lo cual indica que esta levadura se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, aun cuando el habitat vegetal no es tan importante, como fuente de infección en la criptococosis.

En 1992 Ríos Rosas realizó un estudio de 266 muestras obtenidas de materia fecal de 38 especies de aves, en donde encontró que el mayor porcentaje de aislamiento de *C. neoformans*

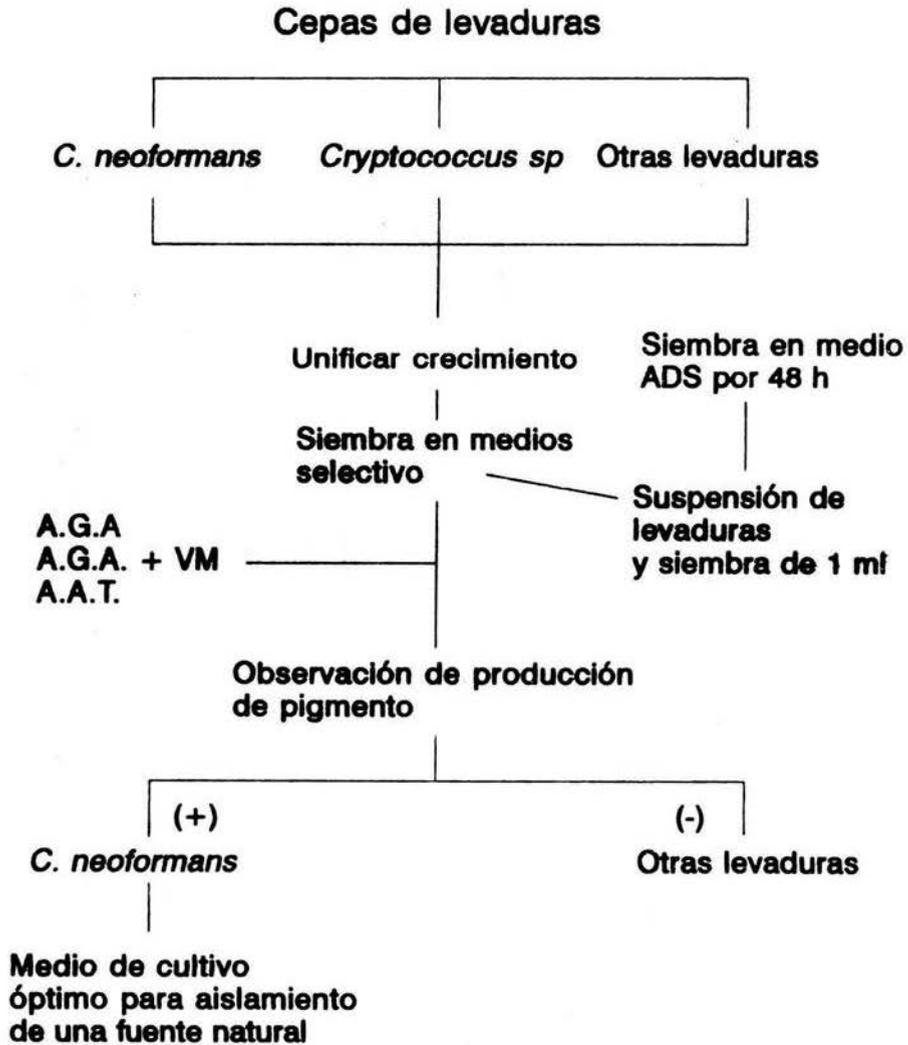
(3.01%), se realizó en galliformes, seguido de psitaciformes en un 1.88%, columbiformes en un 1.13% y passeriformes en un 0.38%.

La criptococosis en México al igual que en muchos países del mundo, es una enfermedad que ha sido poco estudiada debido a que la mayoría de las infecciones son subclínicas o asintomáticas por lo que no se diagnostican, además de que todos los casos que se han presentado no siempre son publicados, pues no se trata de un padecimiento de denuncia obligatoria (González-Ochoa, 1981), por ello, se desconoce la verdadera frecuencia de la infección. El hecho de que *Cryptococcus neoformans* tenga como principal hábitat el excremento de la paloma supondría que los seres humanos en contacto con esta levadura, podrían padecer con frecuencia infecciones asintomáticas. Por ello este trabajo pretende con un muestreo masivo, determinar con mayor precisión la frecuencia y distribución de *C. neoformans* en diversos lugares de la Ciudad de México a partir de los excrementos de la paloma, lo cual permitirá detectar sitios que puedan constituir fuentes de infección importantes.

3. OBJETIVOS

- EVALUAR LA EFICACIA DE TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO Y LA DETERMINACION PRESUNTIVA DE *Cryptococcus neoformans*.
- CONOCER LA FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *Cryptococcus neoformans* A PARTIR DE EXCREMENTOS DE PALOMA (*Columba livia*) EN DIVERSOS SITIOS DE LA ZONA NORTE DE LA CIUDAD DE MEXICO.

DIAGRAMA METODOLOGICO 1. Selección de un medio de cultivo mediante la inducción de pigmento en cepas puras



4. MATERIAL Y METODO

4.1. Determinación presuntiva de *Cryptococcus neoformans* en diferentes medios de cultivo.

4.1.1. Cepas utilizadas.

Los criterios de evaluación de la eficacia de 3 medios de cultivo se hizo en base a la frecuencia con la cual se podía diferenciar *C. neoformans* de otras especies de *Cryptococcus* y de otros géneros de levaduras. Para ello se utilizaron 13 cepas de levaduras, las cuales procedían del cepario del Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Las especies de levaduras a probar fueron las siguientes:

- . *Cryptococcus neoformans* serotipo A
- . *Cryptococcus neoformans* serotipo B
- . *Cryptococcus neoformans* serotipo C
- . *Cryptococcus neoformans* serotipo D
- . *Cryptococcus albidus*
- . *Cryptococcus laurenti*
- . *Candida albicans*
- . *Candida tropicalis*
- . *Candida stellatoidea*
- . *Candida glabrata*
- . *Rhodotorula rubra*
- . *Saccharomyces cerevisiae*
- . *Geotrichum candidum*

4.1.2. Medios de cultivo.

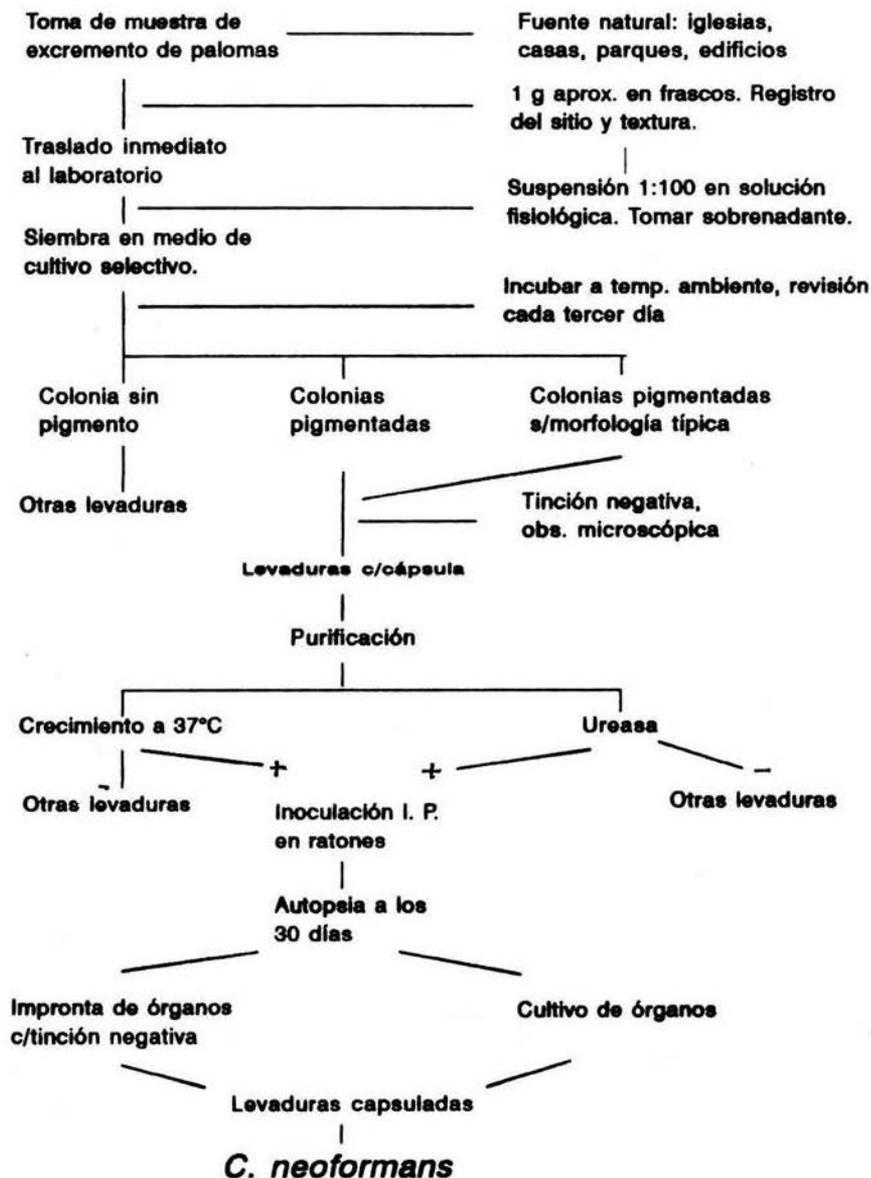
Los medios de cultivo utilizados para la valoración del desarrollo de un pigmento específico fueron: Agar *Guizotia abyssinica* (AGA), Agar *Guizotia abyssinica* más Violeta de metilo (AGA+VM) y Agar Azul Tripiano (AAT) (Ver anexo). El primero por ser el medio selectivo más utilizado para el aislamiento de esta levadura, el segundo por tener un colorante que mejora la intensidad del pigmento, y el tercero por no haber sido comparado antes con el medio de semilla *Guizotia abyssinica*. Los 3 medios son de rápida elaboración y sus ingredientes son fáciles de obtener.

4.1.3. Procedimiento

Con el fin de homogenizar el crecimiento de la cepa de levaduras enlistadas anteriormente, se procedió a resembrar cada una de las cepas en cajas de Petri con medio Agar Dextrosa de Sabouraud (ADS) incubándose posteriormente a temperatura ambiente (25-28°C) en obscuridad, por 48 horas. Al término de este tiempo, de cada cepa se hizo una suspensión de levaduras con solución salina al 0.9%, ajustándose a una concentración de 5×10^7 c/ml (camara de Neubauer). De esta suspensión se tomó 0.5 ml y sembró por estría cerrada y por duplicado en cada uno de los medios de cultivo a probar. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente (25-28°C) en la obscuridad por 5 días.

Se hicieron lecturas cada 24 horas del crecimiento de las cepas y de la presencia ó ausencia de pigmentación (positivo o

DIAGRAMA METODOLÓGICO 2. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de excremento de paloma



negativo) en los tres medios de cultivo.

El medio que resultó mas selectivo para *Cryptococcus neoformans*, fué el utilizado para el aislamiento de la levadura a partir de la fuente natural (excremento de paloma).

4.2. Muestreo y aislamiento de *Cryptococcus neoformans*

4.2.1. Fuente de la muestra.

Para el aislamiento de *C. neoformans* a partir de una fuente natural se colectaron muestras de excremento de paloma procedentes de palomares en 39 sitios escogidos al azar y ubicados en la zona norte de la Ciudad de México y en dos municipios del Estado de México adyacentes al Distrito Federal (Ecatepec y Tlanepantla). Los sitios de muestreo correspondieron a 17 casas particulares, 17 iglesias, 2 edificios y 3 parques. Su distribución geográfica se muestra en la figura 1.

De cada sitio se tomaron de 4 a 6 muestras (de acuerdo al tamaño del palomar) en una cantidad aproximada de 3 gr, éstas se depositaron, con ayuda de una espátula, en el interior de frascos de boca ancha con tapa de rosca previamente esterilizados. Las muestras fueron etiquetadas y remitidas al laboratorio, para su inmediato procesamiento. Se registró la información de la fuente, sitio y textura (fresca ó seca) de cada muestra.

4.2.2. Aislamiento.

De cada una de las muestras, se pesó 1 gr de excremento de

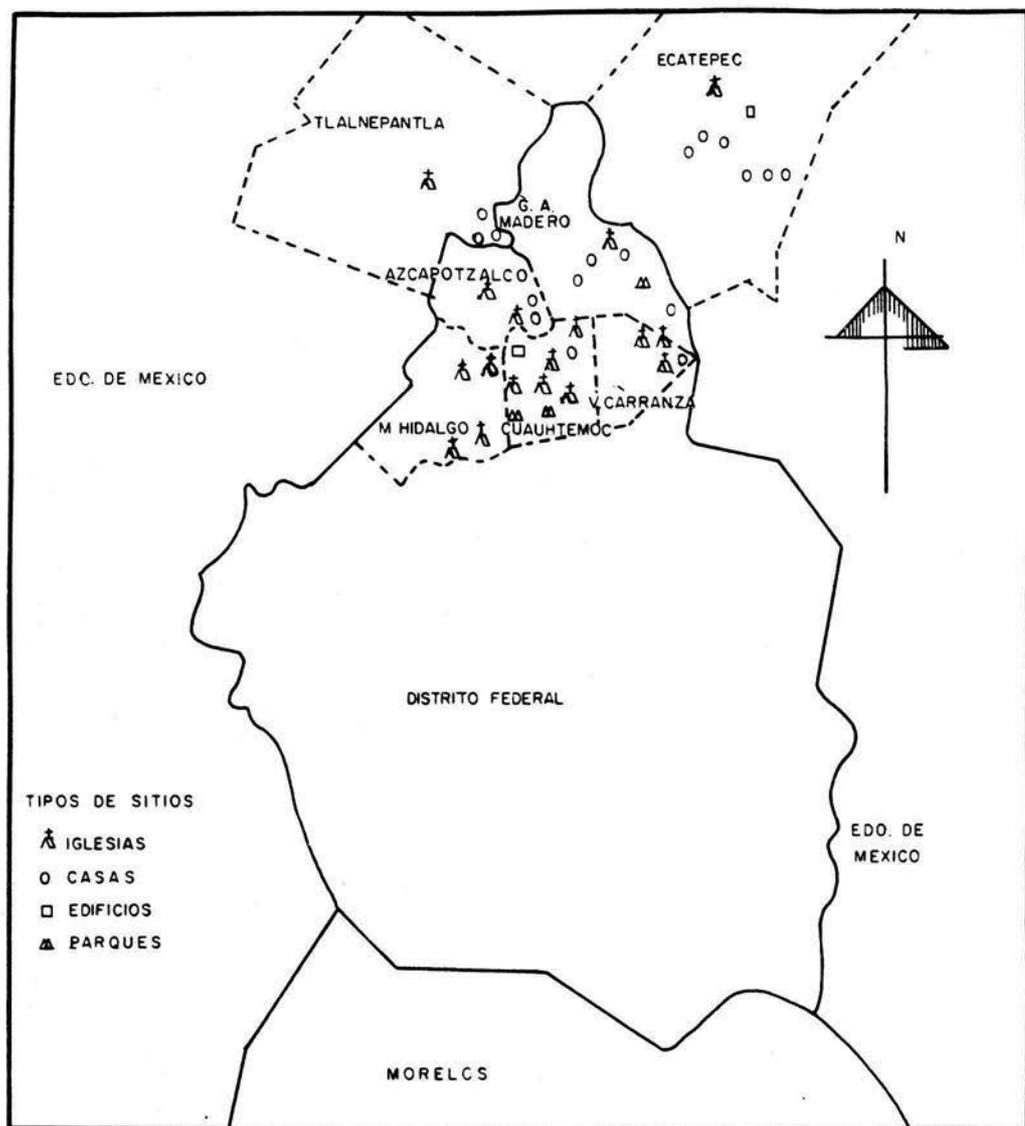


Figura 1. Distribución de los sitios de muestreo en la Zona Norte del Distrito Federal y algunas localidades adyacentes (Ecatepec y Tlanepantla).

paloma y se realizó una dilución 1:100 en solución salina fisiológica estéril (0.9%) y se dejó reposar por 15 minutos. De la superficie de esta suspensión se tomó 0.5 ml y se sembró por estría cerrada en el medio ó los medios de cultivo que fueron seleccionados en el punto anterior. Cada muestra se sembró por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente (25-28°C), en oscuridad con una revisión periódica cada tercer día, durante 15 días.

4.2.3. Determinación de *Cryptococcus neoformans*.

Se seleccionaron aquellas colonias que según el medio de cultivo presentaron un pigmento característico y morfología colonial sugestiva a ser *C. neoformans*.

Toda colonia sospechosa, fue observada al microscopio utilizando la prueba de tinta china para comprobar la presencia de cápsula. Para ello, se colocó sobre un portaobjetos una pequeña gota de tinta, una gota de agua destilada y una asada de la colonia; se mezcló y aplicó un cubreobjetos. Las colonias con morfología microscópica compatible con *Cryptococcus*, se resembraron para su purificación en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo, del cual fueron aisladas. Posteriormente las colonias criptococales se resembraron en tubos con rosca con medio de agar dextrosa de Sabouraud (ADS) inclinado a temperatura ambiente, hasta su determinación taxonómica definitiva.

Para descartar otros géneros de levaduras, las cepas ya puras se inocularon por punción y por duplicado en tubos con

medio inclinado de urea Christensen incubándose a 37°C, con una revisión periódica ya que la reacción ocurre entre las 18 y 48 horas. El desarrollo de un color rosa mexicano en el tubo indica una prueba positiva.

Para diferenciar *C. neoformans* de otras especies de su género, las cepas también fueron sembradas por estría y por duplicado en tubos con medio ADS inclinado y se incubaron a 37°C por 48 horas.

Por último se llevó a cabo la prueba de patogenicidad ya que *C. neoformans* es la única especie de su género que causa enfermedad en ratón. Para ello se trabajó con ratones machos blancos de la cepa Taconic de un peso promedio de 20-25 gramos, utilizando grupos de tres ratones por cada cepa. El inóculo se preparó mediante una suspensión de levaduras en solución salina fisiológica estéril (0.9 %) obtenidas de un cultivo de 48 horas de crecimiento. Posteriormente se realizó una dilución en el volumen necesario para obtener una concentración de 5×10^6 células, lo cual se verificó mediante la cuenta de células en cámara de Neubauer. Utilizando una jeringa de insulina, se inoculó al ratón 0.1 ml, de esta dilución, por vía intraperitoneal. Los animales quedaron en observación durante un período aproximado de 30 a 40 días. Después de este tiempo se realizó la autopsia para buscar levaduras capsuladas, en hígado, bazo, pulmón y cerebro. Esto se hizo a través del examen microscópico de preparaciones en fresco - improntas de los órganos- en tinción negativa (tinta china). Para recuperar las

cepas inoculadas se maceró el órgano con solución salina fisiológica y de la suspensión se sembró en medio de ADS.

5. RESULTADOS

5.1. Selección de medios de cultivo para la determinación de *Cryptococcus neoformans*.

Al comparar la presencia ó ausencia de un pigmento en las cepas de levaduras puras sembradas en los tres medios de cultivo utilizados; se encontró que sólo en los medios AGA y AGA+VM, las colonias de levaduras de la especie *C. neoformans* presentaron una pigmentación marrón, que varió en intensidad del marrón claro al marrón oscuro en el AGA y del marrón oscuro al negro en el AGA+VM. Esta pigmentación se presentó después de 48 horas de incubación y se intensificó después de 76 horas, manteniéndose después constante. Las levaduras de otros géneros no presentaron pigmentación, ni las otras especies del género *Cryptococcus* (Cuadro 3).

En el medio AAT todas las colonias captaron un pigmento azul, que varió en intensidad de acuerdo a los géneros y a las especies probadas, así también como al tiempo de incubación. De esta manera, las variaciones de esta pigmentación fueron como sigue: las cepas del género *Cryptococcus* mostraron una pigmentación azul oscuro a las 48 horas, pero después de este tiempo, las colonias fueron perdiendo paulatinamente la coloración hasta la formación de colonias blanquecinas. Después de 96 horas, se observó un halo transparente alrededor de las colonias por las hidrólisis parcial del medio de cultivo.

Así mismo, en este medio, las colonias de los géneros

CUADRO 3. PRODUCCION DE PIGMENTO POR *Cryptococcus neoformans* Y OTRAS LEVADURAS SOBRE TRES MEDIOS DE CULTIVO

CEPAS	MEDIOS Hr.	AAT			AGA			AGA+VM		
		48	72	96	48	72	96	48	72	96
<i>C. neoformans (A)</i> .		+	+	*	+	+	+	+	+	+
<i>C. neoformans (B)</i> .		+	+	*	+	+	+	+	+	+
<i>C. neoformans (C)</i> .		+	+	*	+	+	+	+	+	+
<i>C. neoformans (D)</i> .		+	+	*	+	+	+	+	+	+
<i>C. albidus</i>		+	+	*	-	-	-	-	-	-
<i>C. laurenti</i>		+	+	*	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>		+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida stellatoidea</i>		+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>		+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>		+	+	*	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula rubra</i>		-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum candidum</i>		-	+	+	-	-	-	-	-	-

(.) SEROTIPO DE *C. neoformans*

(+) CAPTACION DE PIGMENTO

(-) SIN CAPTACION DE PIGMENTO

(*) PERDIDA DE PIGMENTO

AAT. AGAR AZUL TRIPANO

AGA. AGAR *Guizotia abyssinica*

AGA+VM. AGAR *Guizotia abyssinica* MAS VIOLETA DE METILO

Candida y *Saccharomyces cerevisiae* mostraron la absorción de un pigmento azul, pero sin llegar al azul oscuro como en las colonias de *Cryptococcus*. Después de 96 horas, la intensidad del pigmento disminuyó pero no llegaron a perderlo.

Las colonias de *Rhodotorula rubra*, presentaron una pigmentación azul oscuro muy similar a las colonias de *Cryptococcus*, pero en éstas, la intensidad del pigmento fué constante y además las colonias eran de consistencia dura y opacas.

Por otro lado, las colonias de *Geotrichum candidum* absorbieron muy lentamente el pigmento azul del medio; a las 96 horas alcanzaron su mayor intensidad y lo mantuvieron de manera constante. Esta lenta absorción y su morfología macroscópica de colonias irregulares y aterciopeladas, las hizo diferentes del resto de las levaduras.

Por todo lo anterior el medio AAT fue descartado debido a la variación en los resultados y a la dificultad para diferenciar *C. neoformans* de otras levaduras, en especial entre las especies de su mismo género.

Los medios AGA y AGA+VM fueron los seleccionados para el aislamiento restrictivo y presuntivo de *C. neoformans* a partir de muestras de excremento de paloma.

5.2. Muestreo y aislamiento de *Cryptococcus neoformans*.

5.2.1. Sitios con aislamiento positivo.

Se procesaron un total de 202 muestras de excremento de paloma de la especie *Columba livia*, obtenidas a partir de 39 sitios diferentes.

Las colonias de *C. neoformans* desarrollaron una pigmentación marrón claro en el medio de cultivo de AGA y una pigmentación marrón oscuro en el AGA+VM (fig. 2 y 3). En ambos medios las colonias eran además brillosas, convexas y de diámetros que variaron de 1 a 4 mm. Al practicarse los exámenes directos de las colonias con la prueba de tinción negativa, éstas revelaron la presencia de levaduras esféricas rodeadas por una cápsula translúcida (fig. 4). A través de las características de las colonias y de la presencia de cápsula, de los 39 sitios muestreados, se determinaron 24 sitios con aislamiento de colonias susceptibles de ser *C. neoformans*, en su distribución geográfica se muestra que la mayoría de ellas se encontró ubicada hacia la zona central de la ciudad de México (figura 5). Dado que las muestras se sembraron por duplicado en cada uno de los medios de cultivo (AGA, AGA+VM) y de varias fuentes, se obtuvieron 44 muestras positivas: 17 en el medio AGA y 27 en el medio AGA+VM (cuadro 4).

Además de estas muestras con morfología típica, se obtuvieron otras 7 colonias (6 en el medio AGA y 1 en el medio AGA+VM), las cuales si bien no presentaron en un inicio la

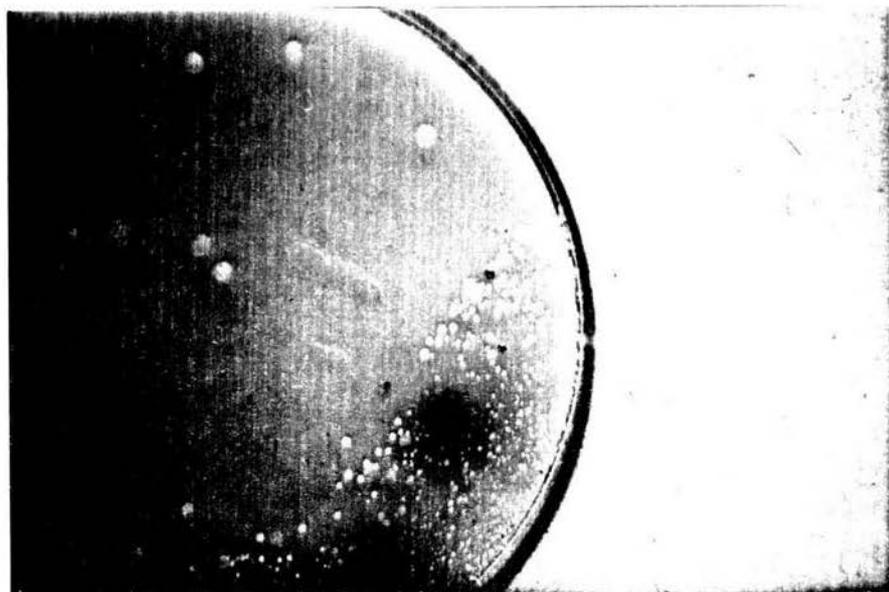


Figura 2. Cultivo de excremento de paloma, despues de cuatro dias a 26°C sobre agar *Guizotia abyssinica* (AGA). Se exhibe un escaso crecimiento de colonia de *Cryptococcus neoformans*, las cuales presentan color marron claro. Se observa el crecimiento adicional de colonias de hongos dematiaceos y levaduras blancas.

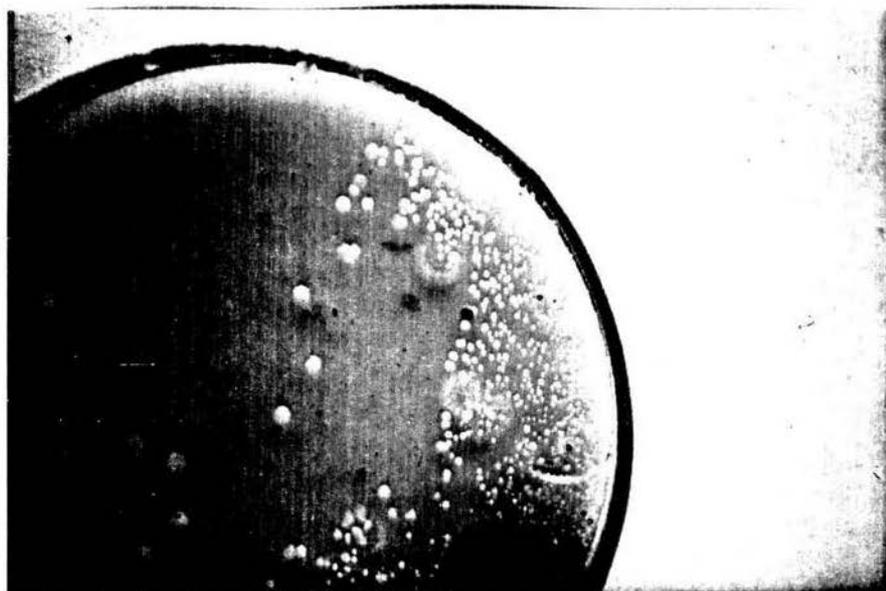


Figura 3. Cultivo de excremento de paloma, despues de cuatro dias a 26°C sobre agar *Guizotia abyssinica* mas Violeta de de Metilo (AGA+VM). Tambien se exhibe escaso crecimiento de colonias de *Cryptococcus neoformans*, las cuales presentaron color negro. Se observa micelio vegetativo de hongos filamentosos y levaduras blancas.

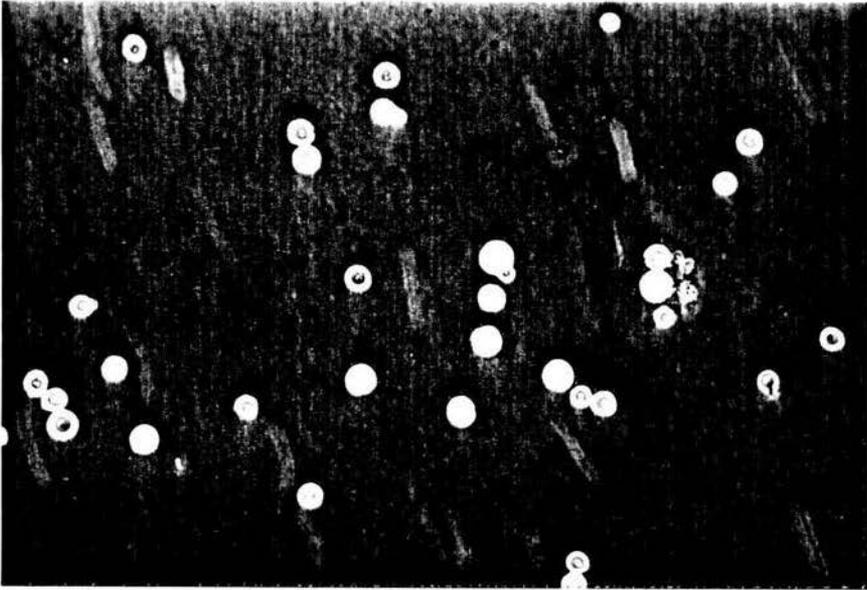


Figura 4. Observación al microscopio de levaduras capsuladas de Cryptococcus neoformans obtenidas a partir de un cultivo de excremento de paloma (método de tinción negativa con tinta china). Notese la cápsula traslúcida y las blastosporas unicigamantes. X 400.

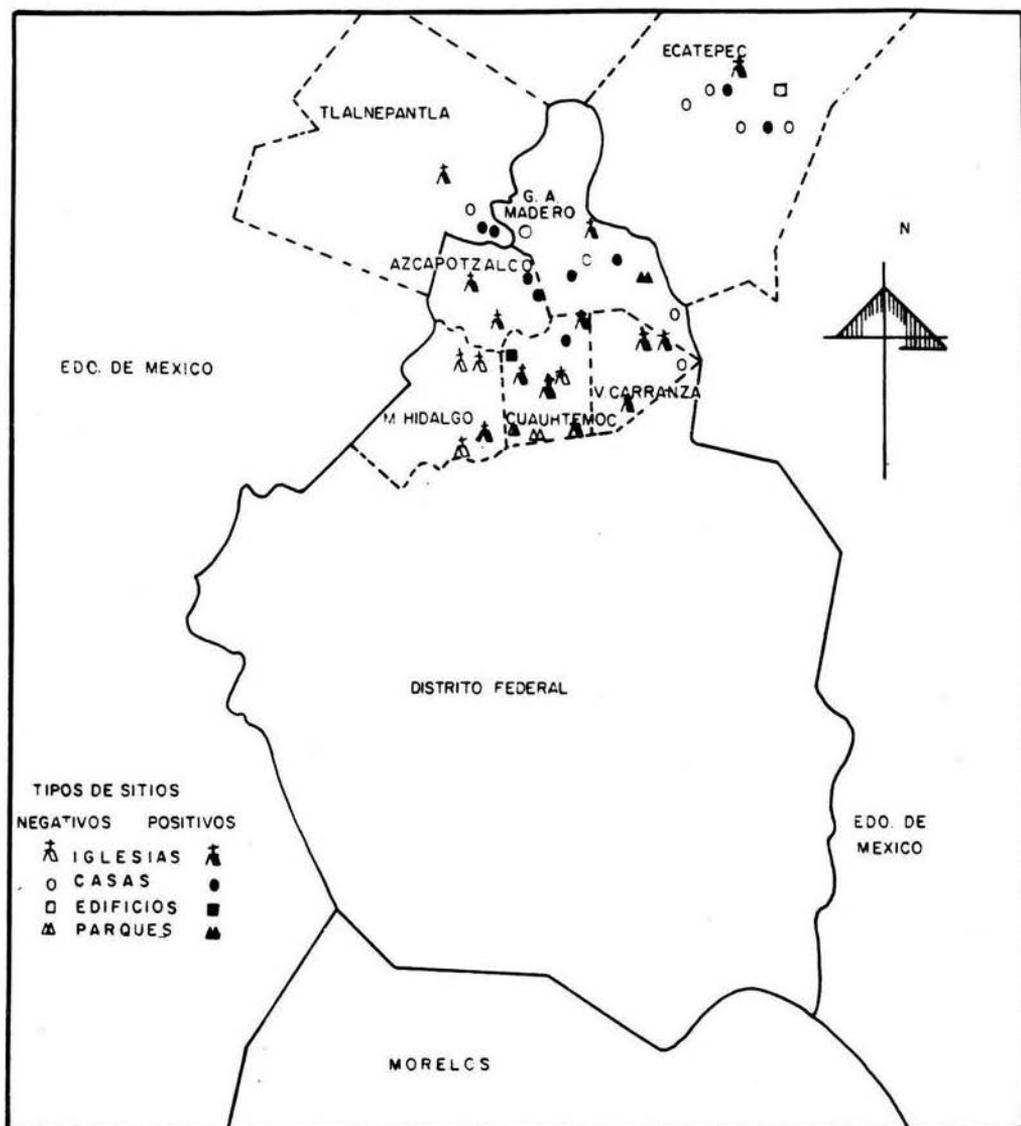


Figura 5. Distribución de los sitios que resultaron positivos en la zona NORte de la Ciudad de México y algunas localidades adyacentes.

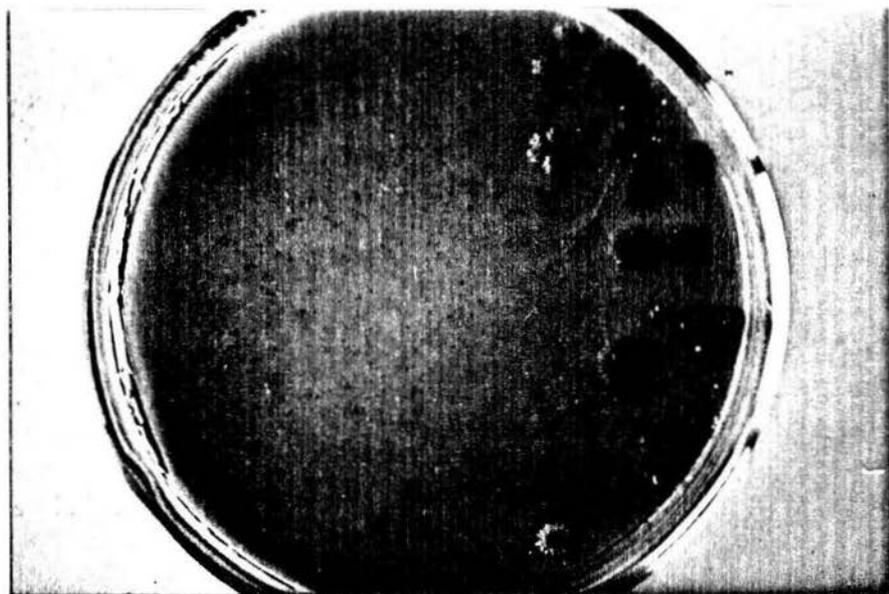


Figura 6. Cultivo de excremento de paloma, despues de cuatro dias a 26°C sobre agar *Guizotia abyssinica*(AGA). Se exhiben colonias que presentan color café marron, pero sin la morfología típica de *Cryptococcus neoformans*.

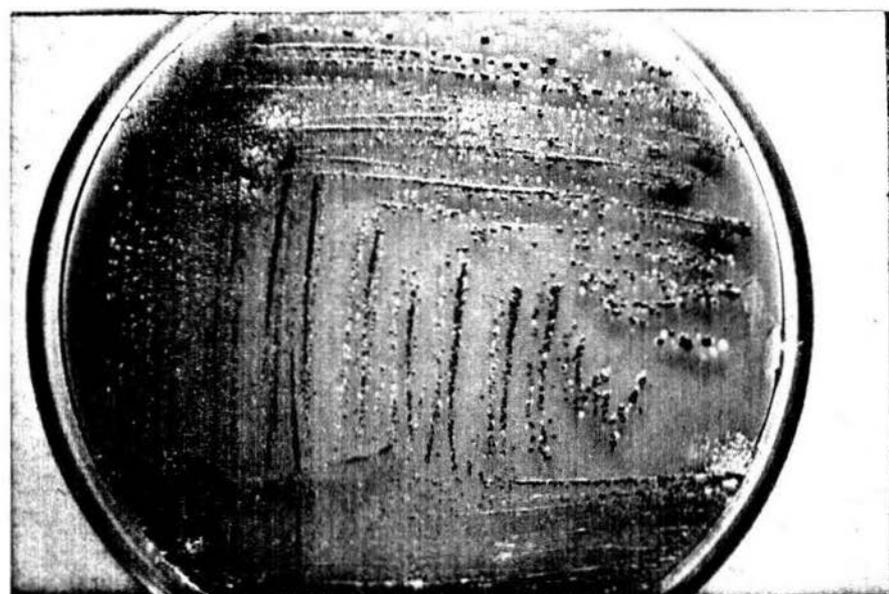


Figura 7. La resiembra de las colonias con morfología no típica en el primocultivo; se observan colonias marrón, brillosas y de bordes lisos características de *C. neoformans* en medio de AGA. El crecimiento de levaduras blancas conjuntamente con *C. neoformans*

morfología colonial característica de *C. neoformans*, si se observó la presencia de levaduras capsuladas al realizar una tinción negativa. Las colonias eran cremosas, de color "beige", bordes irregulares y con tintes marrón en el centro (figura 6).

CUADRO 4. NUMERO DE MUESTRAS POSITIVAS Y TIPO DE CRECIMIENTO EN DOS MEDIOS DE CULTIVO.

TIPO DE CRECIMIENTO	MEDIO AGA	MEDIO AGA+VM	TOTAL
CRECIMIENTO TIPICO	17	27	44
CRECIMIENTO NO TIPICO	6	1	7
TOTAL	23	28	51

Al ser resembradas nuevamente en el medio a partir del cual fueron aisladas, dieron colonias "beige" o marrón (fig. 7). Esto dió un total de 51 muestras con colonias susceptibles de ser *Cryptococcus neoformans*. Se trabajó con todas las colonias aisladas manejando cada una de ellas por separado, de esta manera se obtuvieron los siguientes resultados.

En el cuadro 5 se observa el porcentaje de sitios que resultaron positivos al aislamiento de *C. neoformans*. El 76% de las 17 iglesias analizadas presentó levaduras cryptococales; de las 17 casas el 53%, y de los 2 edificios y 3 parques, solo el

50% y 33% respectivamente resultado positivo. De manera general, tomando el total de sitios positivos a *C. neoformans* se observó que la frecuencia de aislamientos, resultado mayor en las iglesias con un 54% y en las casas con un 38%, en tanto que los edificios y los parques presentaron un 4% de aislamiento en cada uno de ellos.

CUADRO 5. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO *Cryptococcus neoformans* EN LOS SITIOS DE MUESTREO.

ORIGEN	NO. DE SITIOS	NO. DE POSITIVOS	%	% DEL TOTAL DE POSITIVAS
CASAS	17	9	53	38
IGLESIAS	17	13	76	54
EDIFICIOS	2	1	50	4
PARQUES	3	1	33	4
TOTAL:	39	24	61	100

En el cuadro 6 se hace referencia al número y porcentaje de muestras que resultaron positivas al aislamiento de colonias pigmentadas en el medio de cultivo AGA simple. Se aprecia que el 17% de las muestras colectadas en las iglesias presentaron colonias criptococales, en tanto que en las casas fue el 8% y en

los parques el 9%. Del total de muestras que resultaron positivas (23) en este medio, el 65% correspondió a las iglesias, el 30% a las casas y el 4% a los parques. No hubo aislamiento en las muestras obtenidas de los edificios.

CUADRO 6. AISLAMIENTO DE *Cryptococcus neoformans* EN LOS EXCREMENTOS DE PALOMA SOBRE EL MEDIO DE CULTIVO AGA*

ORIGEN	NO. DE SITIOS	NO. DE MUESTRAS	NO. DE POSITIVAS	% POR MUESTRA	% DEL TOTAL POSIT.
CASAS	17	91	7	8	30
IGLESIAS	17	90	15	17	65
EDIFICIOS	2	10	0	0	0
PARQUES	3	11	1	9	4
TOTAL:	39	202	23	11	100

* Agar *Guizotia abyssinica* simple

En el cuadro 7 se aprecian los porcentajes de aislamiento en los excrementos de paloma, cultivados en el medio AGA+VM; y al igual que en el medio anterior, el número de muestras positivas fue mayor en las iglesias (20%), en comparación con las muestras de otros sitios, uno (10%) en edificios y nueve (10%) en casas. Del total de muestras que resultaron positivas en este medio, el

64% correspondió a las iglesias, el 32% a las casas y el 4% a los edificios. No se obtuvieron colonias marrón obscuro de las muestras colectadas de los parques.

CUADRO 7. AISLAMIENTO DE *Cryptococcus neoformans* DE LOS EXCREMENTOS DE PALOMA EN EL MEDIO DE CULTIVO AGA+VM*.

ORIGEN	No. SITIOS	No. MUESTRAS	No. POSITIVAS	% POR MUESTRA	% DEL TOTAL POSIT.
CASAS	17	91	9	10	32
IGLESIAS	17	90	18	21	64
EDIFICIOS	2	10	1	10	4
PARQUES	3	11	0	0	0
TOTAL:	39	202	28	14	100

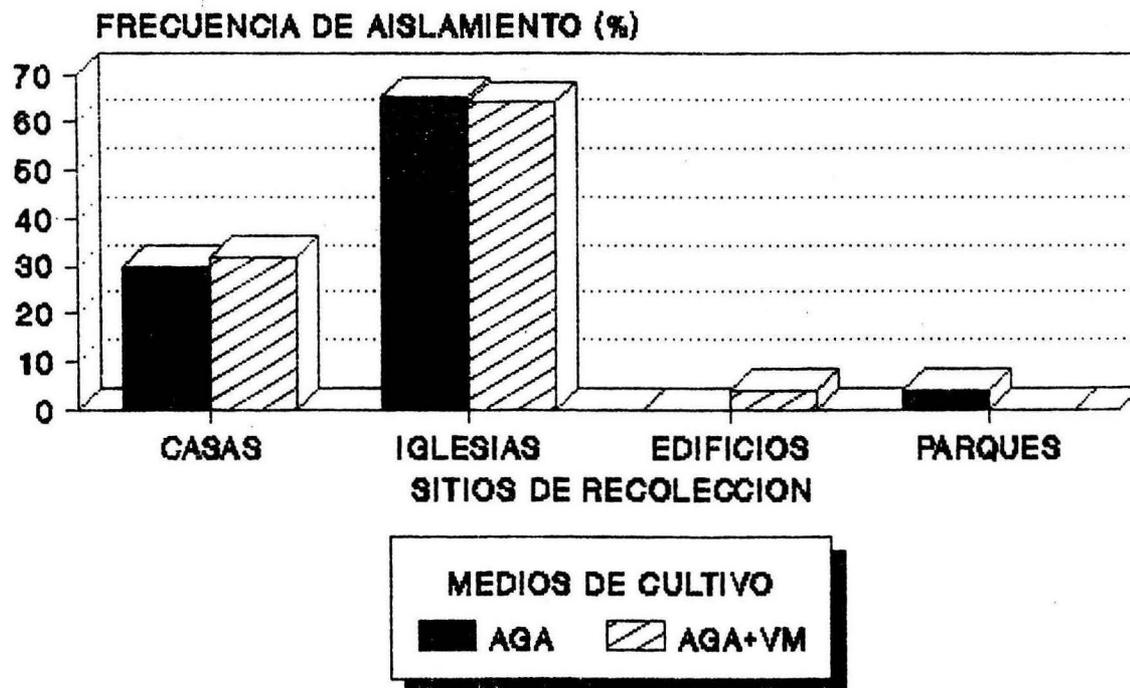
* Agar *Guizotia abyssinica* más Violeta de Metilo

En la figura 8, se ilustra que al confrontar ambos medios de cultivo, el aislamiento de colonias criptococales, fué mayor en las iglesias en comparación con los demás sitios muestreados.

5.2.2. Frecuencia de aislamiento a partir de excrementos secos o húmedos.

En el cuadro 8 se refiere la presencia de *Cryptococcus*

FIGUERA 8
AISLAMIENTO DE *Cryptococcus neoformans*
EN LAS MUESTRAS DE EXCREMENTO DE PALOMA



neoformans en los excrementos de paloma que fueron sembrados en AGA, los cuales se dividieron de acuerdo a la textura de los mismos en frescos y secos. 15 muestras de las 130 (11%) con textura seca fueron positivas, en tanto que de las 72 muestras frescas sólo 8 (11%), fueron positivas. Del total de muestras positivas el 65% correspondió a las muestras secas y un 35% a las colonias aisladas de las muestras frescas.

CUADRO 8. PRESENCIA DE *Cryptococcus neoformans* DE ACUERDO AL TIPO DE EXCREMENTOS DE PALOMA EN EL MEDIO AGA*.

TIPO	NO. DE MUESTRAS	NO. DE POSITIVAS	%	% DEL TOTAL DE POSITIVAS
FRESCAS	72	8	11	35
SECAS	130	15	11	65
TOTAL:	202	23	11	100

* Agar *Guizotia abyssinica* simple

En el cuadro 9 se ilustra la presencia de *C. neoformans* de acuerdo al tipo de excremento (fresco y seco), sembrado en el medio AGA+VM. De las 130 muestras secas 16 (12%) resultaron positivas y de las 72 muestras frescas resultaron 12 (17%) En base

al total de éstas se encontró que el 57% de ellas correspondió a las muestras secas y el 43% a las muestras que aún se mantenían húmedas.

CUADRO 9. PRESENCIA DE *Cryptococcus neoformans* DE ACUERDO AL TIPO DE EXCREMENTO DE PALOMA EN EL MEDIO AGA+VM*.

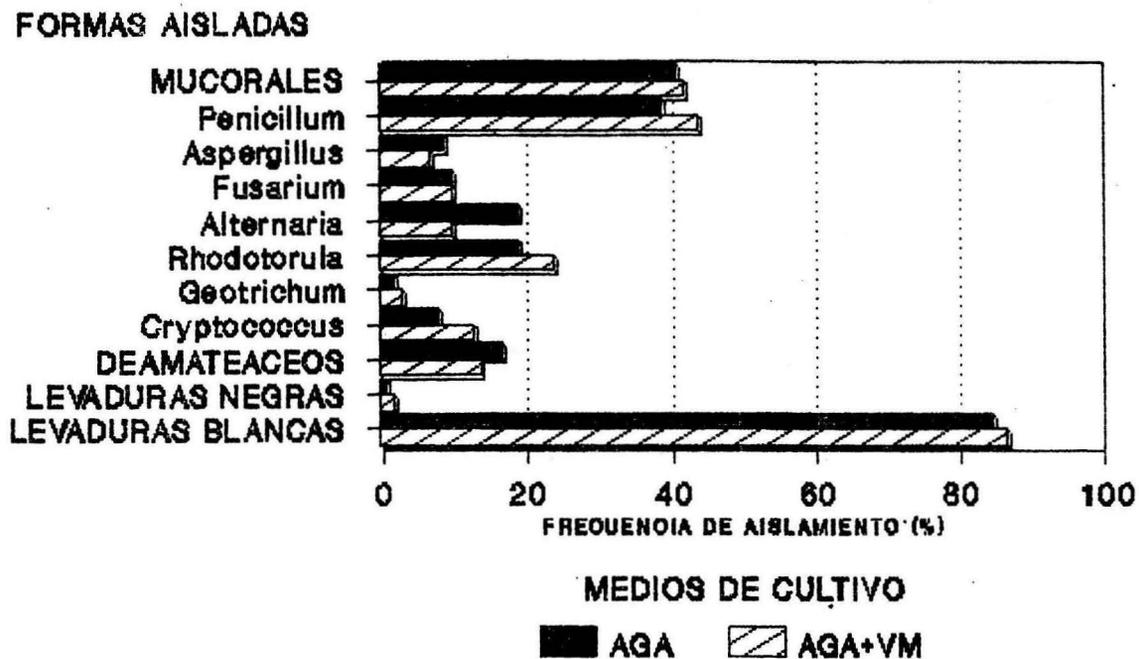
TIPO	No. DE MUESTRAS	No. DE POSITIVAS	%	% DEL TOTAL DE POSITIVAS
FRESCAS	72	12	17	43
SECAS	130	16	12	57
TOTAL:	202	28	14	100

* Agar *Guizotia abyssinica* más Violeta de Metilo

5.2.3. Micobiota asociada a las muestras de excremento de paloma.

En el cuadro 10 se enlistan otros géneros de hongos que fueron aislados juntamente con *Cryptococcus neoformans* y cuyas frecuencias (figura 9) variaron de acuerdo al medio de cultivo. Así, los géneros de *Absidia*, *Mucor* (englobados en el Orden de los Mucorales) y *Penicillium* fueron los hongos filamentosos que aparecieron con mayor frecuencia en ambos medios; mientras que los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y los hongos deamateaceos se presentaron con menor frecuencia.

FIGURA 9
FRECUENCIA DE LOS HONGOS AISLADOS
EN DOS MEDIOS DE CULTIVO



CUADRO 10. FRECUENCIA DE OTROS HONGOS AISLADOS EN 202 MUESTRAS Y SU COMPARACION EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

GENEROS AISLADOS	MUESTRAS EN AGA NO.	% EN AGA	MUESTRAS EN AGA+VM NO.	% EN AGA+VM
MUCORALES	84	41	85	42
<i>Penicillium</i> sp.	78	39	89	44
<i>Aspergillus</i> sp.	19	9	14	7
<i>Fusarium</i> sp.	21	10	21	10
<i>Alternaria</i> sp.	19	19	20	10
<i>Rhodotorula</i> sp.	39	19	48	24
<i>Geotrichum</i> sp.	5	2	7	3
<i>C. neoformans</i>	17	8	27	13
Hongos deamateaceos	35	17	28	14
Levaduras negras	2	1	5	2
Levaduras blancas	171	85	176	87

Dentro de las levaduras que se aislaron en ambos medios solo se determinaron las de los géneros *Rhodotorula* y *Geotrichum*. Las otras levaduras fueron agrupadas como levaduras blancas y negras; las primeras se presentaron en más del 84% de las muestras colectadas, mientras que las levaduras negras fueron escasas.

La presencia de estos hongos en los medios de cultivo, principalmente los Mucorales y las levaduras blancas, impidieron o dificultaron la recuperación de colonias marrón claro o marrón oscuro de las 44 muestras aisladas en el primoaislamiento. Por esta razón sólo se recuperaron 34 (27 colonia típicas y 7 no típicas) a través de las resiembras del total de las 51 muestras iniciales.

5.2.4. Pruebas de determinación.

En el cuadro 11 se registra la hidrólisis de urea y crecimiento en medio de ADS a 37°C de las 34 muestras recuperadas. Sólo 25 muestras (18 típicas y 7 no típicas) presentaron respuesta positiva a ambas pruebas; por otro lado dos fueron negativas a las mismas; 2 tuvieron crecimiento a 37°C, pero ureasa negativa y 5 presentaron ureasa positiva, pero no tuvieron crecimiento a 37°C.

Al mismo tiempo se probaron dos cepas testigo de *C. neoformans* serotipos A y B, las cuales fueron positivas a la hidrólisis de la urea y tuvieron crecimiento a 37°C.

CUADRO 11. PRUEBA DE UREASA Y CRECIMIENTO DE 37QC DE 34 MUESTRAS QUE PRESENTARON COLONIAS PIGMENTADAS, RECUPERADAS DE EXCREMENTO DE PALOMA.

PRUEBAS DE SELECCION	NO. DE MUESTRAS
UREASA + Y 37QC +	25
UREASA + Y 37QC -	5
UREASA - Y 37QC +	2
UREASA - Y 37QC -	2

Para la prueba de patogenicidad de las 25 muestras positivas se escogieron 12 las 18 muestras típicas, por pertenecer a 12 sitios diferentes, además de las 7 muestras no típicas, y las dos cepas testigo de *C. neoformans*.

En el cuadro 12 se muestra la prueba de patogenicidad en el ratón 40 días después de la inoculación. Los ratones inoculados con tres (16%) de la 19 cepas mostraron alteraciones del sistema nervioso central, las cuales estaban caracterizadas por incoordinación y movimientos en círculo, así como hidrocefalia que varió de ligera (apenas perceptible con un elongamiento craneal), a una hidrocefalia severa (caracterizada por un cráneo en forma de domo). Ocho de las cepas (42%) provocaron un estado de alerta constante y una irritabilidad excesiva en los ratones, aún cuando en algunos casos no hubo lesiones de infección visible. Cinco de

las cepas (26%), causaron en el ratón signos de fatiga, la cual se caracterizó con respiración agitada, repetida y poco movimiento.

Con 9 cepas inoculadas (47%), originaron lesiones cutáneas en el ratón, caracterizadas por placas eritemato-escamosas, úlceras y abscesos principalmente a lo largo de la columna vertebral. Un 42% de las cepas no mostraron signos de alteración aparente. Los ratones infectados con la cepa testigo de *Cryptococcus neoformans* serotipo A, desarrollaron sólo síntomas de irritabilidad y los que fueron infectados con *C. neoformans* serotipo B presentaron fatiga.

CUADRO 12. SIGNOS Y SINTOMAS OBSERVADOS EN INFECCION

INTRAPERITONEAL EN RATONES, USANDO 19 CEPAS DE
Cryptococcus neoformans AISLADAS DE EXCREMENTO DE
PALOMA.

SIGNOS Y SINTOMAS	NUMERO DE CEPAS	% DE INFECCION
HIDROCEFALIA	3	16
AFECCION CUTANEA	9	47
IRRITABILIDAD	8	42
FATIGA	5	26
SIN SIGNOS NI SINTOMAS	8	42

Al realizarse el examen microscópico de improntas en fresco de los órganos de los ratones infectados con las colonias aisladas de los excrementos de paloma, se observó la presencia de levaduras capsuladas en por lo menos dos de los órganos estudiados. De esta manera el 95% de las cepas aisladas tuvieron una localización cerebral; el 84% produjeron lesiones en hígado; el 79% en bazo y el 53% en el pulmón (cuadro 13).

CUADRO 13. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PATOGENICIDAD EN RATONES USANDO 19 CEPAS DE *Cryptococcus neoformans* AISLADOS DE EXCREMENTOS DE PALOMA.

ORGANOS INFECTADOS	NUMERO DE CEPAS	PORCENTAJE %
HIGADO	16	84
BAZO	15	79
PULMON	10	53
CEREBRO	18	95
SIN INFECCION	0	0

También se realizaron cultivos de los órganos infectados con el fin de recuperar la cepa, pero sólo fué posible obtener 4 de las cepas inoculadas.

6. DISCUSION

Para el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* se han descrito una gran variedad de medios de cultivo, la mayoría de los cuales evidencian la presencia de la levadura mediante la inducción de un pigmento selectivo de la especie.

En la evaluación de los tres medios de cultivo (AGA, AGA+VM y AAT) utilizando para ello diferentes géneros y especies de levaduras conocidas, se encontró que los medios AGA y AGA+VM presentaron una superioridad sobre el medio AAT, ya que la absorción del colorante azul, que se presenta en este último medio, no fue selectiva para *C. neoformans*, debido a que todas las especies de los 5 géneros probados, absorbieron el colorante. El hecho de que los medios AGA y AGA+VM indujeron la formación de un pigmento sólo en *Cryptococcus neoformans*, apoya la decisión de usar estos medios para el aislamiento primario a partir de sustratos naturales, como el excremento de la paloma.

El medio AAT fue ideado por Vickers para el aislamiento de muestras clínicas, sin embargo, observando los resultados obtenidos, se tendría que esperar 5 días para apreciar la decoloración de las colonias, y después la hidrólisis del medio para poder identificar sólo hasta género a las levaduras de *Cryptococcus*. En cambio en los medios de semilla niger a partir del 2º y 3º día se observan ya, exclusivamente en las colonias de la especie *neoformans*, una pigmentación marrón intensa; esta característica, es importante ya que ahorra tiempo, en caso de

ser utilizado, para el diagnóstico oportuno de la criptococosis.

De hecho Staib, desde 1987 introdujo ya el medio de AGA en la práctica clínica para el diagnóstico de criptococosis en pacientes con SIDA; sin embargo, como lo preconiza Cano (1989), el procedimiento más usual para la identificación de *C. neoformans* y otras levaduras, sigue siendo el medio de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), pues en este medio se obtiene un rápido y óptimo crecimiento de ^{cualquier} ~~este~~ levadura.

En el presente trabajo no se incluyó el medio de ADS para comparar su efectividad como medio de primoincubación, ya que en un estudio previo de Castañón-Olivares y col. en 1988, se había realizado la comparación de este medio (ADS), con el AGA utilizando para ello muestras de excremento de paloma, para el aislamiento de *Cryptococcus*. El AGA mostró una gran superioridad, ya que inducía la pigmentación marrón de *C. neoformans*, y al examen microscópico se reveló la presencia de la cápsula; por el contrario en el ADS la diferenciación se dificultó pues había que examinar al microscopio todas aquellas colonias levaduriformes de tonos cremas y apariencia mucóide, para investigar la presencia de cápsula a través de la prueba de tinta china.

En base a la característica de los medios AGA y AGA+VM, estos fueron utilizados como medios ^o óptimos para el aislamiento de *C. neoformans* a partir de una fuente natural en este caso de los excrementos de paloma.

En la segunda parte de este trabajo, la mayoría de las muestras de excremento de paloma fueron obtenidas de las casas y

de las iglesias; mientras que sólo fué posible muestrear 2 edificios y 3 parques; esto no por que fueran los únicos, sino más bien porque los sitios de anidación y percha de las palomas eran de difícil acceso, como copas de palmas, cornisas de grandes ventanales, áticos de alguna azotea ó tabiques huecos de algún muro; a estos dos tipos de sitios se les considera como hábitats "secundarios" pues sólo son ocupados cuando el palomar original o "primario" - proveniente de una casa o un campanario - se encuentran con una sobrepoblación o bien porque las palomas son obligadas a abandonarlos por limpieza en los edificios, por remodelación, ó por eliminación de la casa palomar. Sin embargo, como esta especie de paloma no es migratoria, y han desarrollado un alto sentido de territorialidad, permanecen en estos sitios o muy cerca de ellos.

A pesar de las diferencias en cuanto al número de muestras, los 4 tipos de lugares analizados aquí, fueron favorables para el desarrollo y crecimiento de *C. neoformans* pues, en todos ellos, se obtuvo por lo menos una muestra positiva lo que conlleva a considerar de acuerdo con Emmons (1960), que el sólo hecho de que exista la dualidad paloma-excremento de paloma, es casi seguro que se aisle la levadura, lo cual convierte a estos lugares en importantes fuentes de infección.

Con el uso de ambos medios de cultivo se pudo determinar que las iglesias son los sitios que constituyen la mayor fuente de infección de esta levadura. Muy probablemente esto este relacionado con el hecho de que aquí se encuentran grandes

acumulos de excremento de paloma al ser palomares "primarios". También se encontró, que tanto el medio AGA como el AGA+VM mostraron un porcentaje de aislamiento muy similar en las muestras obtenidas de iglesias y casas. En base a esto se puede decir que ambos medios son útiles para el estudio epidemiológico de la *Cryptococcus* en la naturaleza, pues el porcentaje de sitios con aislamiento de *C. neoformans* fue del 54% en las iglesias y del 38% en las casas.

No obstante, aunque al analizar estos dos medios por separado, se encontró que con el medio de AGA+VM se logró un mayor aislamiento de colonias de *Cryptococcus* (14%) en comparación con el AGA (11%), la recuperación de las colonias a través de la pos-resiembra en medio de SDA fue menor a partir del medio AGA+VM que del medio AGA. Una explicación a esta situación sería que de acuerdo a Rubio y col. (1894), el colorante violeta de metilo y el difenil actúan como inhibidores de hongos filamentosos y de levaduras como *Candida*, obteniéndose colonias de *Cryptococcus* pequeñas - de 1 mm de diámetro- y con cápsula apenas perceptible como un halo alrededor de la levadura. La acción de estos inhibidores muy probablemente influyen para que en el momento de la resiembra en medio de Sabouraud, las levaduras no pueden reproducirse y crecer nuevamente en el medio de fácil asimilación.

En comparación con el trabajo de Castañon-Olivares y col. (1988), la siembra de la muestra en dilución 1:100 favorece la acción de los inhibidores, ya que se pudo observar un rango de

hasta 5 días sin que se desarrollaran cuerpos fructíferos del micelio, obteniendo una mayor recuperación de *C. neoformans*. En cambio en la dilución 1:10 los cuerpos fructíferos de los hongos filamentosos se disparaban a partir del tercer día impidiendo y dificultando la recuperación de las levaduras.

De las 19 cepas que resultaron positivas a urea y crecimiento a 37°C y que fueron inoculadas en los ratones, 12 tuvieron desde su primoaislamiento una morfología colonial típica y 7 cepas sin morfología inicial típica. Estas 19 cepas causaron infección en ratón. Este hecho confirma que la prueba de patogenicidad de las colonias sospechosas de *C. neoformans*, a través de la inoculación en ratón, es una prueba necesaria para identificar, completar y confirmar la determinación taxonómica de *C. neoformans*.

También la prueba de tinción negativa como menciona Cano y col. (1989), resulta de gran importancia como método de rutina, para el diagnóstico oportuno de pacientes que cursan con probable criptococosis. Por otro lado un factor que podría estar determinando las diferencias en cuanto a los síntomas encontrados en los ratones podría estar dada por el grado de virulencia de la cepa. Rippon (1986) menciona que el principal factor de virulencia en levaduras de *C. neoformans* es la existencia de o el potencial para la encapsulación más que el grado de encapsulación. En este estudio se apreció, que en el primoaislamiento todas las cepas presentaron cápsula, pero a través de la observación de las improntas de los órganos

afectados, aquellos ratones que no desarrollaron lesiones aparentes presentaron levaduras con cápsula pequeñas, en tanto que los que manifestaron hidrocefalia y lesiones cutáneas, presentaron en varios de sus órganos levaduras con cápsulas mayores al diámetro de éstas. Por ello todos los ratones resultaron infectados, pero sólo aquellos que tuvieron mayor capacidad de desarrollar una cápsula grande, desarrollaron una sintomatología severa y grave, tomando en cuenta que el daño producido por ésta levadura es sobre todo mecánico por obstrucción.

La escasa recuperación de las cepas a partir de la maceración de los órganos afectados, no implica que no hubiese infección, pues ya Lim y col. 1980 mencionan que al tratar de recuperar las cepas de los ratones infectados intraparietalmente no siempre presentaron cultivos positivos, obteniendo sólo el 5% en más de un período de autopsias (50 días posinfección). A pesar de esto, ellos atribuyen a todos los animales una infección criptococcica; pues un mínimo del 90 a 95% de éstos adquirieron una respuesta de hipersensibilidad cutánea tardía. Si bien, nosotros no realizamos esta prueba de reacción cutánea, observamos que la tinta china reveló que todas las cepas desarrollaron levaduras en por lo menos dos de los órganos estudiados.

Si bien no pudieron inocularse las 44 cepas típicas que en el primoaislamiento presentaron una pigmentación sugestiva de *Cryptococcus neoformans*, el hecho de que la 19 cepas probadas en

ratones hayan producido lesiones en dos o más órganos estudiados, y que fueron aisladas del 51% de los sitios muestreados, hace pensar que existe un alto riesgo de adquirir la infección por inhalación, siempre y cuando el estado inmunológico del individuo esté deprimido o abatido, pues esta levadura es sobre todo oportunista.

Como las iglesias son los sitios donde se encontró mayor número de muestras positivas, estos palomares constituyen los principales focos de infección de la criptococosis en la Zona Norte de la Ciudad de México, sin dejar de considerar también los palomares domésticos. Estos últimos deberían ser de poca importancia por los cuidados de limpieza que reciben; no obstante la experiencia personal mostró que en muchos de los palomares domésticos el descuido de estas aves es considerable, ya que en dos palomares el grosor del excremento en el piso era de uno a tres centímetros, mayor que el encontrado en algunos campanarios de iglesias. Este hallazgo coincide con la opinión de Hermoso de Mendoza y col. (1987) en el sentido de que el riesgo a la infección por parte de la población en general, es más bien azarosa en las zonas abiertas pues el contacto con las palomas y sus deyecciones se reduce, en comparación con el riesgo que tienen los "columbicultores" domésticos, él cual aumenta puesto que se hallan expuestos a la inhalación masiva de la levadura, por las labores normales de manejo y cuidados de sus aves.

Para poder comprobar experimentalmente esta situación es necesario seguir realizando estudios que nos ayuden a aclarar

cual es la prevalencia de la levadura en estos sitios.

Finalmente se puede considerar en este trabajo que la fuente de infección más probable son las partículas secas del excremento de paloma pues se encontró que más del 50% de las muestras con esta textura fueron positivas a la presencia de la levadura *C. neoformans*, mientras que las muestras con textura fresca fueron positivas en un 39% promedio; probablemente esté relacionado con factores ambientales y fisicoquímicos de cada sitio. De tal manera que esto apoyaría el hecho, de que las partículas secas al ser dispersadas por el viento penetran por inhalación a las vías respiratorias produciéndose así la infección.

Se considera que uno de los principales factores que determinan la presencia de *C. neoformans* en las áreas estudiadas fue la falta de higiene de los palomares en que habitaban estas aves. Es por ello que se proponen las siguientes medidas de prevención y control:

En caso de palomares particulares:

- Eliminación de los excrementos y limpieza frecuente y periódica
- Protección contra la lluvia y la humedad
- Uso de cubrebocas durante la limpieza y aseo del palomar
- Desinfección de las manos.

En caso de sitios colectivos de palomas de vida libre:

- Eliminación de los excrementos y limpieza frecuente y periódica
- Protección contra la lluvia
- Reducción de los sitios húmedos
- No fomentar con alimento la sobrepoblación de palomas
- Remover las palomas de áreas populares a lugares donde su habitat sea desinfectado

Si las áreas abiertas o edificios no están aún habitados, podría utilizarse formaldehído u otro agente para su desinfección.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

1. El medio de Agar Azul Tripano (AAT) resultó ser poco selectivo para diferenciar a *Cryptococcus neoformans* de levaduras de otros géneros y aún de las especies de levaduras del mismo género, debido a que el colorante fue absorbido en mayor o menor cantidad por todas las levaduras analizadas.

2. Los medios de cultivo AGA y AGA*VM son óptimos para el estudio epidemiológico de *C. neoformans*, sin embargo mientras el medio Agar *Guizotia abyssinica* más Violeta de Metilo (AGA+VM) fue más selectivo para evidenciar las levaduras de *C. neoformans* en los excrementos de paloma, con el AGA se logró una mayor recuperación de las colonias sugestivas de ser *C. neoformans*.

3. La prueba de patogenicidad y tinción negativa fueron determinantes para demostrar que aquellas colonias que presentaron morfología sospechosa eran *C. neoformans*.

4. Las iglesias fueron los sitios en los cuales se encontraron mayor número de muestras positivas, constituyendo la principal fuente de infección en la zona estudiada.

5. A partir de los excrementos secos de paloma se aisló un mayor porcentaje de *C. neoformans* en comparación con los excrementos húmedos; los excrementos secos favorecen la dispersión de las levaduras a través del aire constituyéndose en un factor de riesgo para la salud.

6. Es necesario llevar a cabo medidas de control de estas aves, sobre todo en aquellos sitios donde existe una verdadera sobrepoblación de las mismas, aunque esto se vea dificultado por la gran estima que la población en general tiene hacia estos animales por el símbolo o significado de paz y de amor que representan.

9. ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO:

a) Agar Azul tripano (AAT) (BIOXON)

Glucosa	10 gr
Peptona	10 gr
Agar	15 gr
Azul tripano	0.1 gr
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar 15 min 121°C, 15 lb de presión

Enfriar a 50°C

Agregar azul tripano

Vaciar en cajas de Petri de 10 cm de diámetro

b) Agar *Guizotia abyssinica* (AGA) (Agar Staib)

<i>Guizotia abyssinica</i>	50 gr
(semilla de níger)	
Dextrosa	1 gr
KH ₂ PO ₄	1 gr
Creatinina	1 gr
Agar	15 gr
Difenil	100 mg
Cloramfenicol	50 gr
Alcohol etílico absoluto	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Moler la semilla niger en una licuadora en 350 ml de agua destilada

Hervir durante 30 min.

Filtrar y aforar a 1 litro

Disolver la dextrosa, el agar y el KH_2PO_4

Esterilizar 15 min. 121°C, 15 lb de presión

Enfriar a 50°C

Adicionar el difenil y cloramfenicol disueltos previamente en 1 ml de alcohol etílico.

Agitar y vaciar en cajas de Petri de 10 cm de diámetro.

c) Agar *Guizotia abyssinica* más violeta de metilo (AGA+VM)

Este medio se prepara igual que el anterior, sólo que al final se adiciona junto con el difenil y el cloramfenicol, 2 mg de violeta de metilo.

d) Agar Dextrosa de Sabouraud (ADS) (BIOXON)

Glucosa 10 gr

Peptona 10 gr

Agar 15 gr

Agua destilada 1000 ml

Esterilizar 15 min. 121°C, 15 lb. de presión

Vaciar en cajas de Petri de 10 cm de diámetro.

e) Agar Urea de Christensen. (DIFCO)

Base de urea 29 gr

Agua destilada 100 mL

Disolver la base de urea en agua destilada

Esterilizar por filtración milipore

Preparar por separado:

Agar bacteriológico 15 gr

Agua destilada 900 mL

Suspender el agar en agua destilada, hervir hasta disolver.

Esterilizar 15 min 121°C, 15 lb de presión

Enfriar a 50°C

Combinar ingredientes:

Adicionar la base de urea al agar y mezclar bajo condiciones asépticas

Vaciar en tubos estériles alícuotas de 2 mL

Enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada

pH final 6.9

10. BIBLIOGRAFIA

1. Aboul-Gabal, M and Atia, M. 1978. Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. *Sabouraudia*, 16:63-68
2. Bauwens, L., Swinne, D., De Vroey, Ch. and De Meurichy, W. 1986. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the antwerp zoological gardens. *Mycosen*, 29(7): 291-294
3. Bergan, F. 1963. Ocurrence of *Cryptococcus neoformans* in Sweden. *Acta Medica Escandinavica*, 174(5):651-655
4. Bonifaz, A. 1990. *Micología Médica Basica*. Edit. Mendez Cervantes. México., p.:306
5. Calderon, E., Cob, C., González, N., Hernández, M. y Martínez, E. 1977. Cryptococosis del sistema nervioso central. *Bol. Méx. Hosp. Infant.*, 34(1):83-93
6. Cano, D.C., Villareal, U.C., Estrada, A.J.L., Gómez, C.G. y Ramírez, C.F. 1989. Infección por *Cryptococcus neoformans* en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Aspectos clínicos, paraclínicos y terapéuticos. *Rev. Med. IMSS.*, 27(3):175-179

7. Carrada-Bravo, T., Del Campo, P.M., Albarran, P.M.A. y Carrillo, F.J. 1971. Estudio epidemiológico de *Cryptococcus neoformans* en México. Rev. de Invest. en Salud Pública, 31(2):92-105
8. Castañón-Olivares, L.R., Ruedas-Velázquez, M.S., López-Martínez, R. y Hernández, H.F. Aislamiento de *Cryptococcus* a partir de material fecal en la Ciudad de México, Distrito Federal. Mem. del II Congreso de Micología. Cd. Victoria, Tamaulipas, México. p.: 78
9. Cohen, J., Perfect, J.R. and Durack, D.T. 1982. Cryptococcosis and the basidiospore. The Lancet, 5:1301
10. Conant, N.F., Smith, D.T., Baker, R.D. y Callaway, J.L. 1972. Micología. Interamericana. 3ª ed. pp.:224-249
11. Edberg, S.C., Chaskes, S.J., Altire-Werber, E. and Singer, J.M. 1980. Esculin-base medium for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol., 12:332-335
12. Emmons, Ch.W. 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J. Bacteriol., 62:685-690
13. Emmons, Ch.W. 1960. Prevalence of *Cryptococcus neoformans*

in pigeon habitats. Public. Health. Rep., 75(4):362-364

14. Erke, K.H. 1976. Light microscopy of basidia, basidiospores, nuclei in spores and hyphae of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). J. Bacteriol., 128(1):445-455
15. González-Mendoza, A. y López, P.S. 1974. Criptococosis generalizada asociada a leucemia granulocítica crónica. Bol. Soc. Méx. Mic., 8:11-15
16. González-Ochoa, A., Fuentes, E. y Pérez-Tamayo, R. 1959. Criptococosis generalizada. Presentación de un caso. Pren. Med. Méx., 24(9):373-378
17. González-Ochoa, A. 1981. Panorama de las micosis en México. Sal. Pub. Méx., 23(3):213-216
18. Gugnani, H.C., Gupta, N.P. and Shrivastav, J.B. 1972. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in Delhi Zoological Park and its recovery from the sputum of an employee. Indian J. Med. Res., 60(2):182-185
19. Hermoso de Mendoza, S.M., Miranda, G.J., León, V.L. 1987. Criptococosis en paloma. I. Frecuencia de portadores en buche en el área de Córdoba. Rev. Ibérica Mic., 4:121-127

20. Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. Fondo de Cultura Económica, México. pp.:24,181-182,290,394
21. Hopfer, R.L. and Blank, F. 1975. Caffeic acid-containing medium for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.*, 2(2):115-120
22. Iacobellis, F.W., Jacobs, M.I., Cohen, R.P. 1979. Primary cutaneous cryptococcosis. *Arch. Dermatol.*, 115:984-985
23. Jawetz, E., Melnick, J.L. y Alieberg, E.A. 1983. *Microbiología Médica. Manual Moderno*. México. 10ª ed. pp.:319-325
24. Kao, C.J. and Schwarz, J. 1957. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon nests. *Am. J. Clin. Pathol.*, 27(1-6):652-663
25. Koneman, E.W. 1983. *Diagnosticos microbiologicos*. Ed. Médica Panamericana, Argentina. pp.:465
26. Kwon-Chung, K.J. 1975. Description of a new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 67:1197-1200

27. Kwon-Chung, K.J. 1976. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68:942-946
28. Lim, T.S., Murphy, J.W. and Cauley, L.K. 1980. Host-etiological agent interactions in intranasally and intraperitoneally induced cryptococcosis in mice. *Infection and Immunity*, 29(2):633-641
29. Littman, M.L. and Schneierson, S. 1959. *Cryptococcus neoformans* in pigeons excreta in New York city. *Am. J. Hyg.*, 69:49-59
30. Loaiza, L.S. 1988. Cryptococcosis. *Infectología*, 8:387-396
31. López-Martínez, R. and Castañón-Olivares, L.R. 1989. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from Natural Sources. First International Conference on *Cryptococcus-Cryptococcosis*. Jerusalem, Israel. Abstracts. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 313:297
32. Love, G.L., Boyd, G.D. and Greer, D.L. 1985. Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *J. Clin. Microbiol.*, 22(6):1068-1070
33. Montero-Gei, F. and Alvarado, F. 1978. Clinical and

- epidemiological aspect of criptococcosis in Costa Rica. Proceeding of the IV international conference on the black and withe yeast. Pan American Health Organization. World Health Organization. Scientific Publication., 356:195-198
34. Neilson, J.B., Fromtling, R.A. and Bulmer, G.S. 1977. *Cryptococcus neoformans*: size range of infectious particles from aerosolized soil. Infect. Immun., 17(3): 634-638
35. Pal, M., Khan, Z.V. and Randhawa, H.S. 1979. Observations on niger seed creatinine agar as a selective medium from *Cryptococcus neoformans*. Indian J. Microbiol., 19(1):19-22
36. Pal, M. and Mehrotra, B.S. 1985. Studies on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruits and vegetables. Mycosen, 28(4):200-205
37. Poliner, J.R., Brooks, E. and Fernald, G.W. 1979. Localized osseous criptococcosis. The J. Ped., 94(4):597-599
38. Purchio, A., Souza, B., Paula, C.R., Gambale, W., Correa, B. 1988. A new culture medium, for the isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. X Congreso of the Internacional Society for Human and Animal Micology. Barcelona 27/VI-1/VII. pp.:1-6

39. Randhawa, H.S., Clayton, Y.M. and Riddell, R.W. 1965. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon habitats in London. *Nature*, 20:801
40. Refai, M., Taha, M., Selim, S.A., Elshabourii, F. and Youssef, H.H. 1983. Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other yeasts from pigeon droppings in Egypt. *Sabouraudia*, 21:163-165
41. Rendon-Rojas, M.C.J. 1986. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excreta de paloma y gallina. Tesis profesional de Químico Farmaceutico Biologo, ENEP-Cuautitlan Izcalli, UNAM. Edo. de Méx.
42. Rippon, J.W. 1988. *Medical Mycology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. E.U.A. 3ª ed. pp.:532-542
43. Ríos Rojas, C. 1992. Aislamiento e identificación de *Cryptococcus* en materia fecal de aves de zoológico. Tesis Profesional. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
44. Rubio, M., De Vroey, Ch., Chalon, E. and Swinne, D. 1984. An improved medium for the isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings. *Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.*, 22:345-346

45. Ruiz, A., Fromtling, R.A. and Bulmer, G.S. 1981 (a). Distribution of *Cryptococcus neoformans* in nature site. *Infection and Immunity*, 21(2):560-563
46. Ruiz, A. and Bulmer, G.S. 1981 (b). Particle size of airborne *Cryptococcus neoformans* in a tower. *Appl. Eviroment. Microbiol.*, 4(5):1225-1229
47. Ruiz, A., Neilson, J.B. and Bulmer, G.S. 1982 (a). Control of *Cryptococcus neoformans* in nature by factors. *Sabouraudia*, 20:21-29
48. Ruiz, A., Neilson, J.B. and Bulmer, G.S. 1982 (b). A one year study on the viability of *Cryptococcus neoformans* in nature. *Mycopathologia*, 77:117-122
49. Saul, A., Lavalle, P. y Rodríguez, G. 1980. Cutaneous cryptococcosis. *Int. J. Dermatol.*, 19(8):457-458
50. Schonheyder, H. and Stenderup, A. 1982. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon manure on two media inducing pigment formation. *Sabouraudia*, 20:193-197
51. Shields, A.B. and Ajello, L. 1966. Medium from selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 151:208-209

52. Soriano, J. y Caracó, L. 1989. Infecciones en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Estudio de un caso con cryptococosis diseminada mortal. Dermatología, Rev. Mexicana Segunda Epoca., 33(3):178-180
53. Staib, F. and Seelinger, H.P.R. 1966. Un nouveau milieu sélectif pour L'isolement de *Cryptococcus neoformans* des matières fécales et du sol. Annales de L'Institut Pasteur., 110(5): 792-793
54. Staib, F. 1985. Sampling and isolation of *Cryptococcus neoformans* from indoor air with the aid of the router Cintrifugal 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
55. Staib, F., Seibol, M., Antweiler, E., Fröhlich, B. and Weber, S. 1987. The brown color effect (BCE) of *Cryptococcus neoformas* in the diagnosis, control and epidemiology of *Cryptococcus neoformans* infections in AIDS patients. Zbl. Bakt. Hyg. A, 266:167-177
56. Swinne, D.D. 1975. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. Sabouraudia, 13:303-308

57. Swinn, D.D., Kayembe, K. and Niyimi, M. 1986. Isolation of saprofitic *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in Kimshasa, Zaire. Ann. Soc. Belge. Méd. Trop., 66:57-61
58. Vázquez, V. and Anchondo, E. 1987. Criptococosis del sistema nervioso central en el Instituto Nacional de Pediatría. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx., 44(4):202-206
59. Vickers, R.M., Mc Elligott, J.J., Rihs, Jr.J.D. and Postic, B. 1974. Medium containing trypan blue and antibiotic for the detection of *Cryptococcus neoformans* in clinical samples. App. Microbiol., 27(1):38-42