



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



U. N. A. M.

ESTUDIO DEL HABITAT NATURAL DE
Cryptococcus neoformans var. gattii.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
MARIELA I. MENDOZA CABRERA
EDITH ORTEGA SALAS

ASESOR: Ph.D. ROBERTO A. CERVANTES O.
COASESOR: Q.F.B. CAROLINA SEGUNDO Z.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

Estudio del Habitat Natural de Cryptococcus neoformans var. gattii.

que presenta la pasante: Mariela Ibeth Mendoza Cabrera
con número de cuenta: 8754157-5 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
Edith Ortega Salas.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU" 3 de Marzo de 199 5
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a de de 199 5

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Tonatiuh A. Cruz Sánchez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Carolina Segundo Zaragoza</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Stella Maris Regineri Rivera</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

Estudio del Habitat Natural de *Cryptococcus neoformans* var. *pattii*.

que presenta la pasante: Edith Ortega Salas

con número de cuenta: 8754149-6 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :
Maricela Ibeth Menéndez Cabrera.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 3 de Marzo de 199 5

PRESIDENTE	M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez
VOCAL	M.V.Z. Tonatiuh A. Cruz Sánchez
SECRETARIO	Q.F.B. Carolina Segundo Zaragoza
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Marcela Hernández Vargas

[Firma]
[Firma]
Carolina Segundo Z.
[Firma]
[Firma]

AGRADECIMIENTOS

Al PhD. Roberto A. Cervantes Olivares:

Por habernos dado la oportunidad de realizar esta tesis bajo su asesoría.

Al personal del departamento de diagnóstico de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia:

Por habernos brindado su apoyo y permitir utilizar las instalaciones de este departamento.

A nuestros sinodales:

Gracias por su colaboración.

• ***A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán:***

Por habernos abierto sus puertas y vivir momentos inolvidables en sus aulas.

A nuestros amigos de la 14:

Por brindarnos su amistad y apoyo durante la carrera; por darnos ánimos para la culminación de este trabajo.

A todas aquellas personas que no escatimaron en darnos su ayuda en todo momento.

A tí Q.F.B. Carolina Segundo Zaragoza:

Te estamos profundamente agradecidas, por que has sido la persona mas importante que ha estado a nuestro lado desde el principio hasta este momento, ya que sin tu valiosa ayuda nos hubiera sido más difícil llegar a la culminación de nuestra carrera y principio de nuestra vida profesional. Son tantas cosas que hay que agradecerte, como el habernos transmitido tus conocimientos, tu entusiasmo y tu fuerza para salir siempre adelante, pero sobre todo por ofrecernos tu amistad y confianza; por ser como eres gracias.

DEDICATORIAS

A Dios:

Por darme la oportunidad de comenzar a recorrer el camino de la vida, por ser siempre mi mejor compañía y mi mejor consuelo.

A mis papás:

Ma. Antonieta y Alberto: Por ser como son: admirables; que con su amor siempre me han demostrado aún en las dificultades que hay que seguir adelante, por su cariño y paciencia, por todo lo que me han brindado, sin pedir nada a cambio. Muchas gracias queridos papás.

A mis hermanos:

Alberto, Jacque y Ulises: Los quiero mucho, ya que hemos compartido juntos muchos momentos alegres y tristes en nuestra vidas. Por la lata que me dieron para que terminara este trabajo.

A Eduardo:

Porque has estado durante mucho tiempo junto a mí, compartiendo los buenos y los malos ratos, por comprenderme y sobre todo por enseñarme lo que es el amor. Te amo.

A mi amiga Edith:

Que con todo y que eres pequeña, tienes un corazón enorme, gracias por estar siempre conmigo, por tu apoyo y ayuda, te deseo todo lo mejor.

A todas aquellas personas que me han impulsado en esta vida, para lograr que mis sueños se conviertan en realidad.

Muchas Gracias.

MARIELA I. MENDOZA CABRERA.

DEDICATORIAS

Al que era, al que es y al que será:

Tú, Señor, eres mi fuerza; yo te amo. Tú eres mi protector, mi lugar de refugio, mi libertador, mi Dios. Tú Señor, eres digno de alabanza. Salmo 18.1-2.

A mis papás:

Sara y Miguel: Todas las palabras serían insuficientes para agradecer lo que con tanto amor me han brindado, su apoyo, comprensión, consejos y la oportunidad de tener una profesión, ya que el conocimiento es la mejor herencia que me pudieran dar.

A Rosana, Sara Laura y Miguel Andres:

Les agradezco su cariño, su apoyo y sobre todo que hayan soportado mi mal humor.

A mis amigos y hermanos de la iglesia del Pacto:

Por que siempre me apoyaron con sus oraciones y animandome para llegar a la meta deseada.

A tí amiga Mariela:

Por tu valiosa e inigualable amistad, por darme la oportunidad de realizar a tu lado esta parte tan importante en nuestra profesión, gracias por soportarme.

GRACIAS.

EDITH ORTEGA SALAS.

La sabiduría es un patrimonio de la entera humanidad que anda buscando crecimiento moral, intelectual y espiritual.

Torres Pastorino C.

Estudio del Habitat Natural de
Cryptococcus neoformans var.
gattii.

I N D I C E

	Página
RESUMEN.....	1
I.- INTRODUCCION.	
1.- Antecedentes históricos.....	3
2.- Habitat.....	6
3.- Características morfológicas del género.....	8
4.- Patogenia.....	10
5.- Diagnóstico.....	12
5.1.- Clínico.....	12
5.2.- Histopatológico.....	18
5.3.- Serológico.....	18
6.- Tratamiento.....	19
7.- Objetivo.....	19
II.- MATERIAL Y METODOS.	
1.- Recolección de muestras.....	21
2.- Tratamiento de muestras.....	22
3.- Aislamiento.....	22
3.1.- Desarrollo en Medio de Staib.....	22
3.2.- Tinción de Gram.....	23

4.- Pruebas para la identificación de <i>C. neoformans</i> .	
4.1.- Tinción de tinta China.....	23
4.2.- Pruebas Bioquímicas.....	24
4.2.1 Hidrólisis urea.....	24
4.2.2 Prueba asimilación de carbohidratos.	25
4.2.3. Prueba reducción de nitratos.....	27
III.- RESULTADOS.....	29
IV.- DISCUSION Y CONCLUSION.....	36
V.- APENDICE (Preparación de medios y reactivos).....	40
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	44

R E S U M E N

Cryptococcus neoformans es una levadura capsulada, patógena que causa serios problemas en animales y humanos; esta levadura penetra al organismo preferentemente por vía aérea y tiene preferencia por el Sistema Nervioso Central. Posee 4 determinantes antigénicos denominados A, B, C y D, asociados con los polisacáridos capsulares. *Cryptococcus neoformans* presenta dos variedades: *neoformans* (serotipo A y D) y *gattii* (serotipo B y C). El habitat natural de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* se encuentra en las excretas de palomas en todo el mundo, mientras que *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* se cree que su habitat natural tiene asociación con los árboles de *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis*, ya que la distribución global de las semillas de estos Eucaliptos corresponden con la distribución epidemiológica de la Criptococosis causada por esta variedad. En México la variedad más aislada de casos clínicos es la *gattii*, por lo que, es importante conocer la fuente de infección. En el estudio se trabajaron con 500 muestras de árboles de Eucalipto recolectadas de 5 Zonas del área Metropolitana.

Estas fueron procesadas para aislar las diferentes colonias existentes en medio Staib, de estas muestras se obtuvieron 101 aislamientos de levaduras, de las cuales 65 colonias fueron blancas, 33 rosas y 3 negras, y por medio de las diferentes pruebas utilizadas de rutina para la identificación de *Cryptococcus*, como la tinción de tinta china y pruebas bioquímicas (hidrólisis de urea, asimilación de carbohidratos y reducción de nitratos) se encontró al género *Cryptococcus* en 30 ocasiones de las cuales 13 colonias pertenecieron a la especie *albidus*, 8 a la especie *laurentii*, 5 a *uniguttulatus* y 4 a la especie *terreus*; además de aislar a este género también se aislaron 33 colonias del género *Rhodotolura*, 14 del género *Saccharomyces*, 10 del género *Candida* (5 de la especie *rugosa*, 3 de la especie *guilliermondii*, de las especies *pseudotropicalis* y *krusei* se aisló una colonia de c/u), 8 del género *Trichosporon*, 5 colonias fueron no tipificadas, en las cuales se encuentran tres colonias de levaduras negras, y por último se aisló una colonia del género *Hansenula*. De las 500 muestras trabajadas no se logró el aislamiento de *Cryptococcus neoformans*, lo cual difiere de estudios, donde reportan a los árboles de Eucalipto como habitat natural de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, Por lo que se sugiere continuar con estudios en relación a la flora y fauna que circunda los árboles de Eucalipto, con el fin de determinar el habitat natural de esta variedad en México.

I. - I N T R O D U C C I O N

1.- ANTECEDENTES HISTORICOS.

En 1894 Busse informó el aislamiento de una levadura proveniente de la tibia de una mujer; Busse describió a los microorganismos como de naturaleza fungal, denominándolos como *Saccharomyces hominis*. En el mismo año Sanfelice, en Italia aisló del jugo de durazno una levadura capsulada que la denominó *Saccharomyces neoformans*. (2,23). La primera denominación de *Cryptococcus* se debe a Vullemin (1901), quien estudio la morfología y características de la cepa, comprobó que no tenía la capacidad de formar ascosporas, como lo hace el género *Saccharomyces* y por lo tanto, lo llamo *Cryptococcus hominis*.

Stoddard y Cutler (1916) de manera errónea supusieron que la cápsula del microorganismo eran quistes en el tejido causados por la acción digestiva del hongo (histolítico) y llamaron al microorganismo *Torula histolytica*; finalmente fué reclasificada como *Cryptococcus neoformans*. (2,23). En 1949 Evans estableció y diferenció a tres serotipos de *Cryptococcus neoformans* designándolos A, B y C. Veinte años después Vogel aisló e identificó de un caso clínico un cuarto serotipo que más adelante fué confirmado por Wilson et.al. en otros casos clínicos, denominándolo serotipo D. (13). Un estudio de los cuatro serotipos realizado por Kwong-Chung et.al. reveló que los serotipos A y D son similares y diferentes a los serotipos B y C, tanto en sus aspectos ecológicos, epidemiológicos, bioquímicos y genéticos. (12). Debido a las diferencias entre el par de serotipos AD y BC *Cryptococcus neoformans* fué dividido en dos variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C). (5,13). En 1975 Kwon-Chung describió el estado sexual de *Cryptococcus neoformans*, denominando al estado perfecto de la levadura como *Fillobasidiella neoformans* y lo colocó en el género *Fillobasidiella* dentro de los *Ustilaginales* (23). La figura No.1, nos muestra el ciclo de vida de *Cryptococcus neoformans* en sus fases de reproducción sexual y asexual. (10).

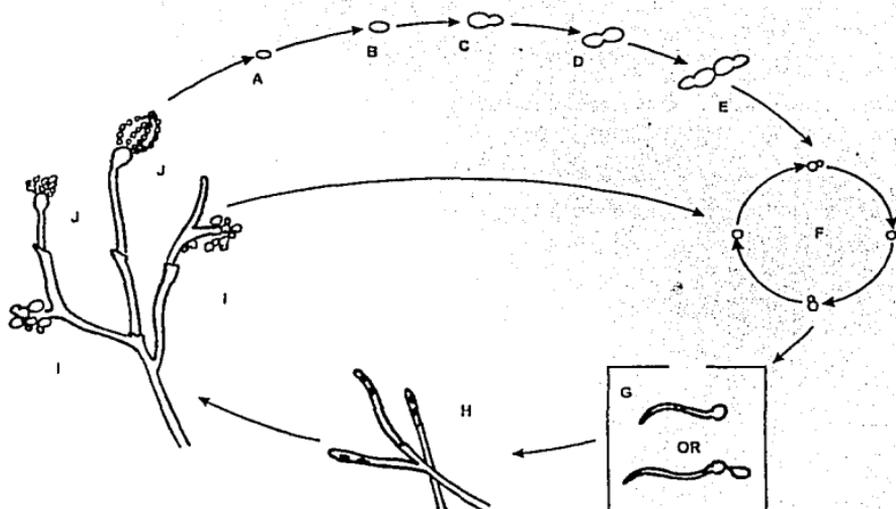


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Cryptococcus neoformans* ilustrando las fases de reproducción asexual y sexual. (A-E) Tumefacción de basidiosporas haploides y posterior formación de brotes. (F) Ciclo asexual de las células levaduriformes de *Cryptococcus neoformans*. (G) Iniciación de la formación de hifas por células levaduriformes sexualmente compatibles previamente conjugadas. (H) Hifas dicarióticas con conexiones. (I) Células levaduriformes con brotes. (J) Basidios y basidiosporas formados en los extremos de la hifa. (Según Keith, H.E., 1976.).

En la actualidad la clasificación taxonómica de *Cryptococcus neoformans* tanto en su fase sexual como asexual es la siguiente: (2)

	FASE ASEXUAL	FASE SEXUAL
CLASE	Deuteromyces	Basidiomycetes
SUBCLASE	Blastomycetidiæ	Teliomycetidiæ
ORDEN	Cryptococales	Ustilaginales
FAMILIA	Cryptococaceæ	Ustilaginaceæ
GENERO	<i>Cryptococcus</i>	<i>Fillobasidiella</i> <i>Fillobasidium</i>
ESPECIE	<i>neoformans</i>	<i>neoformans</i>

2.- HABITAT.

A pesar de que se informó que el microorganismo había sido aislado de leche y jugos de frutas no se había establecido por completo su habitat natural hasta el trabajo de Emmons, quien estableció que el habitat mas importante de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* es el guano de algunas aves como palomas y gallinas (23); los cuales se convierten en hospederos o vectores indirectos que mantienen al microorganismo pero no adquieren la enfermedad (6).

El guano de las aves es alcalino y tienen una gran cantidad de productos nitrogenados, que mantienen viable al microorganismo por varios meses. (2,23). Sin embargo, hasta 1984 no se tenía ningún conocimiento sobre el habitat natural de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* año en que Kwon-Chung en un estudio demostró que esta variedad prevaleció en climas tropicales y subtropicales, por ejemplo: Africa Central, Camboya, Thailandia, Vietnam, Brasil, Australia, Hawaii, Sureste de California y México; por lo que los micólogos han puesto atención a la vegetación de estas regiones, ya que en esta se puede hallar el habitat natural de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. (12,18).

Ellis y Pfeiffer en 1990 reportaron por primera vez el aislamiento de esta variedad en muestras obtenidas de árboles de Eucalipto. Ellos recolectaron de la región del valle de Barossa, en Australia muestras de la vegetación existente. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* fué repetidamente aislada, pero solamente del material asociado con *Eucalyptus camaldulensis*, de su madera, corteza, hojas y desechos acumulados debajo de los árboles. Del resto de la vegetación y desechos colectados de este sitio fueron negativos indicando esto una asociación específica entre *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* y *Eucalyptus camaldulensis*. (5,27).

Ellos mismos en 1992 establecieron una nueva asociación entre *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* y *Eucalyptus tereticornis*. (19). La dispersión de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* aparentemente ocurre después de la primavera y acompañado de la floración de los eucaliptos. Debido a esto se cree que la propagación en el aire por este hongo se presenta por periodos cortos. (5,6).

Eucalyptus tereticornis y *Eucalyptus camaldulensis* han sido exportados y tienen una distribución mundial similar. Ambos pertenecen al grupo de las gomas rojas. Las dos especies están estrechamente relacionadas y solamente se distinguen por el tamaño y forma de su opérculo. (19).

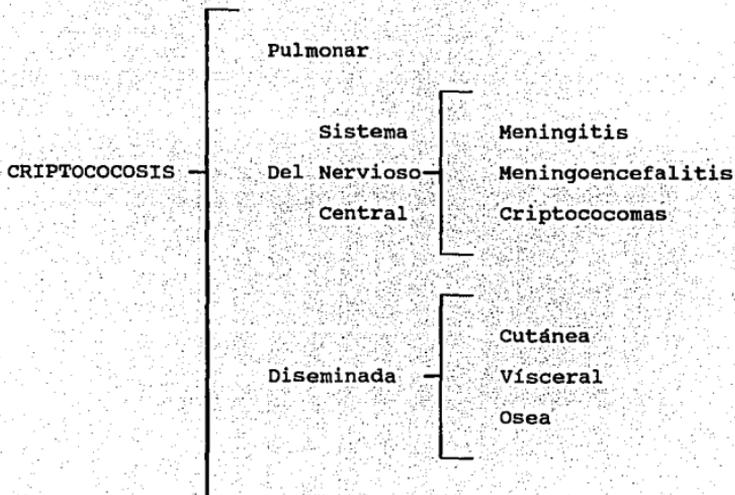
3.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL GENERO.

Cryptococcus neoformans es un hongo levaduriforme capsulado que llega a medir de 15 a 20 μ m. de diámetro con gemas de la mitad de su tamaño, el resto lo forma la cápsula que llega a ser hasta tres veces el tamaño de la levadura. Las células son esféricas o globosas, presentándose solas o en pares, algunas veces en grupos. No forma pseudomicelio ni clamidosporas y en suero no produce tubo germinativo.

Este microorganismo se desarrolla en los medios de cultivo habituales como son: Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y extracto de levaduras. Su crecimiento es inhibido por la ciclohexamida. En medio SDA genera colonias mucoides, limitadas, convexas, brillantes de color blanco amarillento, con aspecto de leche condensada. En algunos medios de cultivo y en resiembras posteriores, su cápsula tiende a reducirse o inclusive a desaparecer. (2,23). En los ambientes sapróbios estos microorganismos casi no presentan cápsula. Al parecer la existencia de la cápsula, es el factor de virulencia importante de *Cryptococcus neoformans*; ya que se han comprobado diversos efectos sobre la respuesta inmune, sobresaliendo la inhibición de la fagocitosis y el estímulo de la producción de los linfocitos T supresores, estos fenómenos se explican en base a la composición química de la cápsula, la cual esta formada de manosa, xilosa y ácido glucorónico en relación 3:2:1 respectivamente y 2 % de grupos O-acetil, los cuales forman un compuesto alfa-glucoro-xilomanana unido a moléculas de manosa. (9,13,22,23,29).

4.- PATOGENIA.

Cryptococcus neoformans es el agente etiológico de la criptococosis, que es una micosis cosmopolita de curso subagudo o crónico, se caracteriza por afectar inicialmente pulmones y posteriormente se disemina a piel y vísceras con predilección hacia el Sistema Nervioso Central (SNC). (2,23). *Cryptococcus neoformans* puede afectar a cualquier individuo, sin embargo, la criptococosis se ve favorecida cuando existe una disminución en las defensas del paciente, por lo regular se presenta en pacientes diabéticos, desnutridos, o bien deprimidos inmunológicamente. (2). La clasificación clínica de la criptococosis es la siguiente: (2).



La criptococosis pulmonar al parecer se inicia por la inhalación de las basidiosporas (4,6), estas llegan hasta los alveolos atravesando las vías respiratorias, generando el primer contacto pulmonar, que la mayoría de las veces cursa de manera subclínica o asintomática. *Cryptococcus neoformans* prolifera rápidamente si no existe una adecuada defensa celular, en especial células mononucleares. Si el proceso infeccioso no se detiene, los microorganismos se diseminan por la vía linfática y hematógena, con predilección hacia el SNC, en este sistema las lesiones se desarrollan en las meninges y afectan los nervios craneales, tallo cerebral y cerebelo. A partir de este foco puede diseminarse hacia otros órganos como: vísceras, piel y huesos. Las levaduras de *Cryptococcus neoformans* pueden penetrar por vía cutánea dando una criptococosis primaria, con la formación de un chancro o lesión inicial donde puede evolucionar formando una lesión granulomatosa ulcerada. (2).

Además de afectar a humanos *C. neoformans* también infecta a animales. En vacas provoca mastitis micótica ocasionando deformación mamaria, disminución en el volumen de la leche y producción de secreciones viscosas. En los casos graves se afectan los ganglios linfáticos regionales y los más profundos. (28). En gato, perro, visón y felinos se presenta inflamación ulcerativa de la mucosa nasal y entérica, meningitis y neumonía. (28). También se ha informado de infección esporádica en otros animales. (23).

5- DIAGNOSTICO.

Para establecer un diagnóstico es importante aislar e identificar al microorganismo que esta produciendo el daño, basándose en estudios clínicos, histopatológicos y serológicos.

5.1. Clínico:

Las muestras que se utilizan para el diagnóstico de la criptococosis son: a) Lavados bronquiales, b) Líquido cefalorraquídeo (LCR), c) Exudados, d) Biopsia y e) Suero. Tratándose de la siguiente manera: (2).

1.- Tinción de Gram: Se realiza a todas las muestras excepto al suero y tejido de biopsia, para observar que tipo de microorganismos se encuentran. Cuando hay presencia de levaduras se realizan las siguientes pruebas: (24).

- Tinción negativa de tinta china: Esta tinción se utiliza para observar la cápsula de *Cryptococcus* en muestras de lavados bronquiales, exudados y LCR, observandose células en gemación de 4 a 20 um. con una cápsula alrededor de la célula de 1-20 um. blanca y brillante. (24).

- Cultivo: Las muestras de: lavados bronquiales, exudados y LCR, son cultivadas en medios de primoaislamiento como el agar dextrosa Sabouraud (SDA) y extracto de levadura. (2,23).

En 1962 Staib creó un medio selectivo que permite el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a base de extracto de semilla de *Guizotia abyssinica* de otros contaminantes, donde este microorganismo genera un pigmento color café-marrón, debido a que este transforma el ácido cafeínico que contiene el extracto de la semilla en un compuesto polimérico de estructura similar a la melanina. (13,21,25,26).

5.1.1. Pruebas para diferenciar a *Cryptococcus neoformans* de otros géneros y especies levaduriformes.

Para distinguir a *Cryptococcus neoformans* de otros géneros de levaduras, es importante tomar en cuenta las características morfológicas y bioquímicas de estas, por lo que es conveniente, realizar las pruebas que se resumen en el Cuadro No. 1. (7).

La principal especie patógena del género *Cryptococcus* que afecta a humanos y animales es la *neoformans*, sin embargo, también han sido implicados ocasionalmente en infecciones en humanos a *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus*. (4,23). Las pruebas que se realizan para diferenciar a las especies del género *Cryptococcus* se presentan en el cuadro No. 2.

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS GENEROS DE LEVADURAS FRECUENTEMENTE AISLADAS.

PRODUCCION	<u>C. neoformans</u>	<u>Candida sp.</u>	<u>Rhodotorula sp.</u>	<u>Saccharomyces sp.</u>	<u>Trichosporon</u>
Cápsula	+	-	-	-	-
Ureasa	+	-	+	-	-
Pseudohifas	-	+	-	-	+
Pigmento en medio niger	+	-	-	-	-
Ascosporas	-	-	-	+	-
Basidiosporas.	+	-	+	-	-
Pigmentación caratenolde	-	-	+	-	-

CODIGO DE TABLA: (+) POSITIVO. (-) NEGATIVO. (Según Bonifaz, A., 1.).

(14)

FALLA DE ORIGEN

CUADRO 2. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNAS DE LAS ESPECIES DEL GENERO Cryptococcus.

PROPIEDADES	<i>C. neoformans</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. terreus</i>	<i>C. unguicollatus</i>
Ureasa	+	+	+	+	+
Crecimiento a 37 C.	+	- ⁺	+ ⁺	+ ⁺	- ⁺
Crecimiento a 40 C.	+	-	-	-	-
Util. KNO ₃	-	+	-	+	-
Virul. ratón	+	-	-	-	-
HALMILACIÓN CHOS					
Glucosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+ ⁺	+
Sacarosa	+	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	+ ⁺	-
Galactosa	+	+ ⁺	+	+ ⁺	- ⁺
Inositol	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+ ⁺	+	- ⁺	+
Ferment. CHOS	-	-	-	-	-

CODIGO DE TABLA: POSITIVO (+), NEGATIVO (-), VARIACION DE CEPAS (*). (Según Segundo Z-C. 24).

La Prueba Biológica de Patogenicidad en ratón, es una prueba auxiliar en el diagnóstico de *Cryptococcus neoformans*, ya que esta levadura es la única especie en su género patógena para el ratón. (24). Con el fin de producir la infección, las levaduras de *Cryptococcus neoformans* se obtienen de un cultivo de 2 a 4 días de desarrollo y se suspenden en solución salina, debiéndose inocular aproximadamente de 1×10^4 a 5×10^6 células por vía intratecal (esta cantidad esta contenida en 0.02 a 0.03 ml. de la suspensión). La infección se manifiesta entre los 8 y 15 días después de la inoculación, provocando en los ratones alteraciones a nivel de Sistema Nervioso Central. (23,24).

5.1.2. Prueba para diferenciar a *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.

Una de las pruebas mas utilizadas para la diferenciación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, es el medio canavanina-glicina-azul de bromotimol. Este medio cuenta con glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, un análogo de la arginina, la canavanina como un inhibidor selectivo, se adiciona azul de bromotimol al medio como indicador de pH. Su uso se basa en las diferencias bioquímicas que presentan las variedades de *Cryptococcus neoformans*.

Así la variedad *gattii* no es inhibida por la canavanina a diferencia de la variedad *neoformans* cuyo desarrollo si resulta inhibido. La alcalinidad indicada por un cambio de pH, refleja el resultado de la producción de amonio, a su vez, producto de degradación de la creatinina, que proviene de la utilización del análogo de la arginina, la canavanina. (7,11,21,22).

Otra de las pruebas utilizadas para diferenciar a estas dos variedades es la inhibición de la ureasa con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), en la que *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* presenta una inhibición en la síntesis de la ureasa debido a la presencia del EDTA, mientras que en *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* no se presenta este fenómeno (14). También se utiliza la prueba de asimilación de la D-prolina en la que *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* tiene la capacidad de utilizarla como fuente de nitrógeno (3).

5.2. Histopatológico:

Entre los métodos utilizados para el diagnóstico de esta micosis se encuentra el examen histopatológico, que tiene una doble finalidad: la observación de la respuesta microscópica del tejido y del agente causal en tales lesiones. (23).

Algunas de las tinciones histopatológicas utilizadas para la observación de estructuras micóticas son: Hematoxilina-Eosina (H&E), ácido peryódico de Schiff, Grocott-Gomori (23); una tinción específica para *Cryptococcus neoformans* es la de Mucicarmina de Mayer, en donde la pared celular levaduriforme y la cápsula se tiñen de color rojo. (23,24).

5.3 Serológico:

Los procedimientos inmunológicos pueden ser utilizados para dar una rápida y presuntiva evidencia de infección. Se reconoce que la protección inmunológica a las infecciones por hongos esta mediada por la respuesta celular, mientras que la respuesta humoral sirve como un parámetro de diagnóstico. (24). Una prueba para detectar el antígeno del polisacárido capsular de *Cryptococcus*, es la aglutinación en latex, que presenta una alta sensibilidad (cerca del 90%). (13).

6.- TRATAMIENTO.

El fármaco estándar para el tratamiento es la anfotericina B en una dosis de 0.4 a 0.8 mg./kg./día por vía intravenosa. (22). Sin embargo, se han obtenido resultados con la 5-fluorocitosina a una dosis de 150 mg./kg./día por vía bucal. (22). Se ha establecido la eficacia del tratamiento combinado usando Anfotericina B y 5-fluorocitosina, creandose un sinérgismo aumentando su potencia y disminuyendo la toxicidad. (23). También se han utilizado los Imidazoles administrados por vía oral, obteniendose resultados variables. (22). El éxito terapéutico dependerá en gran medida de la rapidez con la que se establezca el diagnóstico y del estado del paciente. (2).

Debido a que *Cryptococcus neoformans* provoca afecciones importantes en humanos, es necesario conocer el o los posibles focos de infección, con el fin de establecer medidas de prevención y/o erradicación. Con respecto a *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* se sabe que la principal fuente de infección es el guano de las palomas, por lo que, hay que evitar un contacto excesivo con los lugares contaminados por estos. En el caso de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, hasta hace algunos años se desconocia el habitat natural de dicha variedad.

Ellis y Pfeiffer en 1990 (5), reportaron por primera vez el aislamiento de esta variedad en muestras obtenidas de *Eucalyptus camaldulensis* y dos años después aislan a este microorganismo de *Eucalyptus tereticornis* (19), se ha visto que la distribución epidemiológica de esta variedad esta relacionada con la distribución geográfica de estos árboles, esto indica que una posible fuente de contaminación por este microorganismo en el medio ambiente esta dado por los árboles de Eucaliptos. (6,18,19). En México en un estudio realizado en 1988 de muestras clínicas, se demostró que el 89.3 % de los casos correspondieron a la variedad *gattii* (8), lo que nos indica que es importante conocer el habitat natural de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en México. Por esta razón el objetivo de este trabajo es llevar a cabo el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de árboles de *Eucalyptus*, con el fin de establecer su habitat natural.

II.- M A T E R I A L

Y

M E T O D O S.

1.- RECOLECCION DE MUESTRAS.

Se muestrearon 500 árboles de Eucalipto seleccionados de cinco zonas del área Metropolitana, investigaciones nos sugieren que las especies de estos árboles comunmente encontradas en esta área son: *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis* y *Eucalyptus globulos*. De cada árbol se recolecto: corteza, hojas, flor y opérculo, los cuales fueron almacenados en sobres de papel para su transporte al laboratorio de trabajo y su posterior procesamiento.

2.- TRATAMIENTO DE MUESTRA.

Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: Se tomó una pequeña cantidad de hojas, corteza, flor y opérculos estos fueron macerados y vertidos en frascos que contenían 20 ml. de agua destilada previamente estéril. Los frascos se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar por un período de 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, de la suspensión obtenida se tomaron de 5 a 10 ml., los cuales fueron centrifugados durante 15 minutos a 2500 rpm., el sobrenadante fue decantado y del sedimento se tomo una asada para sembrar por dilución en medio de Staib. (5).

La centrifugación de las muestras favorece la disminución de microorganismos contaminantes, en especial de hongos filamentosos y permite la observación de el desarrollo levaduriforme.

3.- AISLAMIENTO.

3.1 DESARROLLO EN MEDIO STAIB:

Los cultivos fueron incubados a 37°C por un período de 7 a 10 días, estos fueron revisados diariamente para la búsqueda de colonias levaduriformes.

3.2 TINCION DE GRAM:

Esta tinción se utiliza para diferenciar los crecimientos bacterianos de los levaduriformes (5,24). Así, en el caso de observar levaduras, la(s) colonia(s) se resiembran en medio de Staib por la técnica de estriado por dilución para su purificación. Una vez puras las cepas se almacenaron en viales que contenían agar dextrosa Sabouraud, manteniéndose a 4°C.

4.- PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACION DE *Cryptococcus neoformans*.

Las levaduras aisladas se identificaron utilizando las pruebas de: tinta china, hidrólisis de urea, asimilación de carbohidratos y reducción de nitratos. Pruebas utilizadas de rutina para la identificación de *Cryptococcus neoformans*.

4.1 TINCION DE TINTA CHINA:

Esta técnica se utiliza con el fin de observar la cápsula del género *Cryptococcus* que es característica, por lo cual, se realizó un frotis con una gota de tinta china y el microorganismo; y por refringencia con el microscopio se puede demostrar la presencia de la cápsula como una zona sin teñir alrededor de la célula. (23,24).

Interpretación:

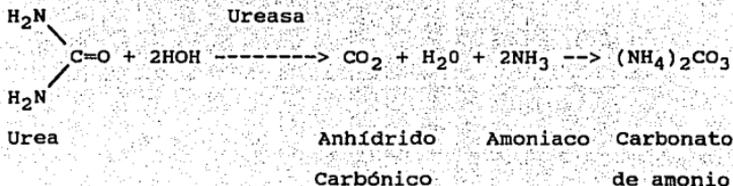
Presencia: Células gemantes de 4 a 20 micrómetros observándose alrededor de las células la cápsula de 1 a 20 micrómetros, blanca y brillante.

4.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

4.2.1 HIDROLISIS DE UREA DE CHRISTENSEN.

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida. Todas las aminas (RCO-NH_2) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución la urea se hidroliza dando carbonato de amonio como producto final. La ureasa es una importante enzima vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. (17).

Fundamento: Esta prueba determina la capacidad que tiene un microorganismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.



La producción de urea es característica y útil para la identificación de *Cryptococcus*, sin embargo, *Candida krusei* y miembros del género *Rhodotorula* y *Trichosporon* también pueden tener esta propiedad.(7,16).

Procedimiento de la prueba:

Inocular los tubos que contienen el medio urea con un cultivo fresco de 48 horas, por medio de estria en el agar. Incubar a 37°C. Observar durante 24, 48 y 72 horas.

Interpretación:

Reacción positiva: Color rosa intenso en todo el agar.

Reacción negativa: No se produce cambio de color (amarillo).

4.2.2 PRUEBA ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS:

Generalmente se utiliza un caldo peptonado libre de carbohidratos, al que se le adiciona el carbohidrato que se desea probar como sustancia de la reacción. La concentración de los carbohidratos incorporados en el caldo básico con rojo de fenol es comunmente de 1%. Los carbohidratos utilizados para esta prueba fueron: glucosa, lactosa, sacarosa, dulcitol, inositol, rafinosa, xilosa, trehalosa, celobiosa, galactosa, melibiosa y maltosa.(16,17).

FUNDAMENTO: Determina la capacidad de un microorganismo de oxidar a los azúcares y otros compuestos orgánicos en las que intervienen las enzimas secretadas por el microorganismo para degradar las sustancias en alcoholes y anhídrido carbónico.(16).

enzima

Indicador de pH + CHO -----> H₂CO₃ + cambio de color

Procedimiento de la Prueba:

Los carbohidratos como todos los medios líquidos, se siembran mediante una suspensión de levaduras o colocando una colonia en el medio mediante la agitación del asa. El cultivo para la inoculación debe de ser fresco (24-48 horas de crecimiento). La incubación se realiza a 37°C. durante 24, 48 y 72 hrs.

Interpretación:

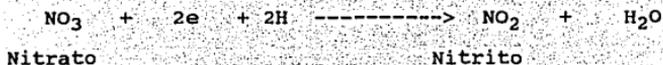
Reacción positiva: Se observa por el cambio de coloración de rojo a amarillo. En algunas ocasiones pueden presentarse reacciones de alcalinización, en estas condiciones el medio se observa de un color rojo mas intenso que el color original.

Reacción negativa: Sin cambio de coloración (rojo).

4.2.3. PRUEBA REDUCCION DE NITRATOS:

Esta prueba es útil para diferenciar a las especies de *Cryptococcus*, ya que algunas especies presentan características similares en la asimilación de carbohidratos.

Fundamento: Determina la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre. La reducción del nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. (16).



Sin embargo, las posibilidades del producto final de reducción del nitrato son muchas nitrato, amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nitroso o hidroxilamina. El mas común es el nitrógeno molecular (un gas) por medio de la reducción del nitrito. Estos productos según las condiciones del medio ya no son mas oxidados o asimilados en el metabolismo celular, sino que se excretan en el medio circundante. En la reducción del nitrato pueden producirse varios procesos para la utilización de los productos terminales formados. La reducción por lo tanto, se manifiesta por la presencia de un producto final catabólico o la ausencia de nitrato en el medio.

En esta prueba se utiliza un medio con nitratos como caldo o como agar en pico de flauta. Sin embargo, se recomienda el uso de un medio semisólido que contenga 0.2 a 0.4% de agar, ya que favorece la reproducción, permite el movimiento de los microorganismos, difunde rápidamente los nutrientes y productos de desecho. (16).

Procedimiento de la prueba:

Inocular los tubos que contienen el agar nitrato con la levadura, dejar incubar 48 horas a 37°C. Con el fin de detectar la presencia de nitritos añadir al cultivo crecido 1 ml. del reactivo A y 1 ml. del reactivo B, mezclar y leer después de 2 minutos.

Interpretación: Positiva: Color rosa o rojo intenso.

Negativa a la presencia de nitritos: Sin cambio de color.

Si no se detecta la presencia de nitritos es posible que la reacción de reducción de nitratos haya continuado hasta otros productos. En este caso añadir polvos de Zinc para confirmar la ausencia de nitratos, y la lectura será la siguiente: Positiva: Sin cambio de color; Negativa: Coloración rosa o rojo intenso.

Finalmente los resultados obtenidos en las pruebas ya mencionadas se compararon con los cuadros 1 y 2, los cuales resumen las características de algunos géneros de levaduras frecuentemente aisladas y de algunas de las especies del género *Cryptococcus*.

III.- R E S U L T A D O S

De las 500 muestras del árboles de Eucalipto se obtuvieron crecimientos bacterianos y de hongos filamentosos los cuales no fueron considerados en este estudio; también se presentaron crecimientos positivos a levaduras en 101 muestras, mientras que 399 muestras fueron negativas al desarrollo de estas. Se observó que de las 101 muestras positivas a levaduras, 65 de ellas presentaron pigmentación blanca, 33 fueron rosas y 3 fueron negras al desarrollarse en el medio Staib.

A las levaduras con pigmentación blanca se les realizó las pruebas de rutina para la identificación del género *Cryptococcus*. Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas además de la asimilación de carbohidratos se resumen en el cuadro 3. Reuniendo los resultados obtenidos de las características morfológicas y bioquímicas de las 101 levaduras se obtuvo que: 33 (32.67%) colonias pertenecen al género *Rhodotorula*, las cuales fueron caracterizadas debido a que produjeron un pigmento caratenoide que iba de un color rojo a rosa, además de degradar la urea. 30 (29.70%) colonias al género *Cryptococcus*, 14 (13.86%) a *Saccharomyces cerevisiae*, 10 (9.90%) al género *Candida*, 8 (7.92%) a *Trichosporon beigelli*, 5 (4.95%) fueron levaduras no tipificadas en las cuales se encuentran dos levaduras blancas y tres levaduras negras, las tres últimas fueron ureasa positiva, en el medio de agar dextrosa sabouraud se desarrollaron de un color verde olivo a negro, levaduriformes, que con el tiempo presentaron un desarrollo filamentososo en los extremos. De acuerdo a estas características se podría suponer que estas colonias pertenezcan a los géneros *Exophiala* ó *Wangiella* (23). También se encontró una colonia (.99%) de *Hansenula anomala*. El número y por ciento de colonias aisladas de los diferentes géneros se resumen en el cuadro 4.

C U A D R O 3
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

No. MTNA.	TINTA CHINA	UREA	ADIMILACION DE CARBOHIDRATOS										KNO3	
			GLU	MAL	SAC	LAC	GAL	MEL	CEL	INO	XIL	RAF		TRE
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-
8	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
10	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
14	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-
15	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	-
16	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-
17	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+/-	-
18	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
19	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+/-	-
20	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	-
21	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	-
22	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+/-	-

CODIGO DE TABLA: (+)POSITIVO, (-)NEGATIVO, (+/-)VARIACION DE CEPA.

(31)

FALLA DE ORIGEN

C U A D R O 3
(CONTINUACION)

NO. MINA.	TINTA CHINA	UREA	ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS											HNOS	
			GLU	MAL	SAC	LAC	GAL	MEL	CEL	INO	XIL	RAF	TRF		DUL
23	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	-	+	+	+/-	+/-	-
24	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-
25	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
26	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-
27	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-	-
28	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-
29	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-
30	+	+	+	+/-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	-	+	+/-	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	-
32	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	-	-
33	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-
34	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+/-	+	+/-	-	-
35	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+	+	+	-	-	-
36	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-	-
37	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
38	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
39	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+/-	-	-
40	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
41	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
42	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	-	+/-	+	+/-	-
43	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
44	-	+	+	-	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	-

CODIGO DE TABLA: (+)POSITIVO, (-)NEGATIVO, (+/-)VARIACION DE CEPAS.

(32)

FALLA DE ORIGEN

C U A D R O 3
(CONTINUACION)

Nu- MTRA.	TINTA CHINA	UREA	ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS											TRE	DUL	INOS
			GLU	MAL	SAC	LAC	GAL	MEL	CEL	INO	XIL	RAF				
45	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	-
46	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
47	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
48	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
50	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
51	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	-	+	-	-	-
52	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-	-	-
53	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-
54	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-
55	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	-	+	-	+	+	-	-
56	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-
57	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
58	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+/-	-	+	-	-	-
59	+	+	+	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
60	+	+	+	+/-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
61	+	+	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+	+	-	+	+/-	+	+
62	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
63	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
64	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+/-	+	+
65	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+/-	+	+	+	+	-	-

CODIGO DE TABLA: (+)POSITIVO. (-)NEGATIVO. (+/-)VARIACION DE CENA.
GLOARIO DE ABBREVIATURAS DE LOS CARBOHIDRATOS: GLU; GLUCUCOSA. MAL; MALTOSA.
SAC; SACAROSA. LAC; LACTOSA. GAL; GALACTOSA. MEL; MELIBIOSA. CEL; CELEBIOSA.
INO; INOSITOL. XIL; XILOSA. RAF; RAFINOSA. TRE; TREHALOSA. DUL; DULCITOL.

(33)

FALLA DE ORIGEN

Cuadro No. 4
Número y porcentaje de géneros aislados

Género	No. colonias aisladas	% Total
<u>Rhodotorula</u>	33	32.67
<u>Cryptococcus</u>	30	29.70
<u>Saccharomyces</u>	14	13.86
<u>Candida</u>	10	9.90
<u>Trichosporon</u>	8	7.92
No tipificadas	5	4.95
<u>Hansenula</u>	1	.99
Total	101	99.99

De las 30 colonias aisladas del género *Cryptococcus* se obtuvieron varias especies, de las cuales 13 (43.33%) colonias pertenecen a la especie *albidus*, 8 (26.66%) a la especie *laurentii*, 5 (16.66%) a *uniguttulatus* y 4 (13.33%) a la especie *terreus*. Del género *Candida* se aislaron 10 colonias encontrándose diferentes especies, de las cuales 5 (50%) pertenecen a *Candida rugosa*, 3 (30%) a *Candida guilliermondii*, una (10%) a *Candida pseudotropicalis* y una (10%) a *Candida krusei*. Los cuadros 5 y 6 resumen el número de las especies aisladas del género *Cryptococcus* y *Candida*.

Cuadro No. 5	
Número de las especies del género <u>Cryptococcus</u> aisladas	
Espece	No. colonias aisladas
<u>C. albidus</u>	13
<u>C. laurentii</u>	8
<u>C. uniguttulatus</u>	5
<u>C. terreus</u>	4

Cuadro No. 6	
Número de las especies del género <u>Candida</u> aisladas	
Espece	No. colonias aisladas
<u>C. rugosa</u>	5
<u>C. guillermondii</u>	3
<u>C. pseudotropicalis</u>	1
<u>C. kruseii</u>	1

IV.- D I S C U S I O N

Y

C O N C L U S I O N

De acuerdo a los resultados obtenidos las especies aisladas en este trabajo del género *Cryptococcus* son: *albidus*, *laurentii*, *uniguttulatus* y *terreus*, las cuales se localizan principalmente en aire, agua, desechos y detritus vegetales (1,23). En un reporte sobre el habitat natural de *Cryptococcus* a partir de excretas de palomas y gallinas se aisló de este al género *Rhodotorula* y levaduras negras que fueron identificadas como de los géneros *Exophiala*, *Wangiella* (22). Es importante mencionar que en el presente trabajo también se aislaron a estos géneros, además de otras levaduras que su habitat se encuentra donde existe materia orgánica en descomposición, como ejemplo: *Saccharomyces*, *Candida*, *Trichosporon* y *Hansenula* (1).

De las especies aisladas del género *Cryptococcus*, no se encontró la especie *neoformans* var. *neoformans*, sin embargo, sabemos que esta variedad es comunmente aislada de excretas de palomas (22,23). Ellis y Pfeiffer (5,6,19) han reportado el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de diferentes especies de árboles de Eucalipto en Australia y California. Estos aislamientos fueron realizados en épocas de floración del árbol de Eucalipto y en las partes bajas del mismo (5); para la obtención de muestras a partir de estos árboles se requería de muestrear de 30 a 40 cms. abajo de los restos que caen del Eucalipto, esto es, flores, hojas y corteza. Cabe mencionar que en Australia los árboles de Eucalipto llegan a perder gran parte de su corteza, situación que no sucede con los árboles de Eucalipto en México. Por otro lado, en nuestro país los Eucaliptos se encuentran en floración gran parte del año, por lo que, no se considera que la floración sea un factor que determine la presencia del hongo. Las condiciones climatológicas pueden influir en los procesos biológicos y metabólicos de los árboles de Eucalipto produciendo sustancias inorgánicas y orgánicas que pueden ser aprovechadas por *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* como sucede en los casos de los aislamientos en Australia.

Ellis y Pfeiffer en 1990 en Australia muestrearon 2100 árboles de Eucalipto, obteniéndose 35 aislamientos de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (5), que corresponde al 1.6 % de aislamientos. En este estudio el número total de muestras trabajadas fué de 500 árboles de Eucalipto, de los cuales no se logró el aislamiento, comparando este resultado con los resultados obtenidos en Australia, la probabilidad era de obtener en ocho ocasiones a *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.

En un estudio hecho en Australia en 1993 en muestras de árboles de *Eucalyptus camaldulensis* y *tereticornis* y de diferentes desechos de plantas incluyendo contaminantes que se encontraban alrededor de *Eucalyptus camaldulensis* se encontró a *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (20). Por lo tanto, una probabilidad podría ser que el nicho ecológico de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* no sea solamente el árbol de Eucalipto, sino que también sea constituido por los productos de desechos de la flora y fauna que rodean el habitat de estos árboles. En la ciudad de Rio de Janeiro, Brasil se estableció una nueva asociación entre muestras de excremento de murciélago y *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (15). El estudio se basó en recolectar 83 muestras de excremento de nidos, gallineros y de otros lugares relacionados con el habitat de aves (especialmente de palomas) y murciélagos, sin embargo, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* solo fué aislado del excremento de murciélagos.

Los autores sugieren que la presencia de este mamífero forma parte del ciclo biológico de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, tomando esto como punto de referencia es importante considerar que nuestras muestras fueron tomadas de áreas urbanas, zonas que por sus características es difícil que se establezca alguna población de murciélagos, sin embargo, la mayoría de los casos clínicos se han presentado en estas áreas, por lo que creemos que la presencia de este mamífero, no es un factor que influya en la presencia de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en la ciudad de México. Por lo anterior, se concluye que el habitat natural de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, no es solamente los árboles de *Eucalyptus*, sino estos son parte del nicho ecológico que favorece el desarrollo y propagación de este microorganismo en el medio ambiente en México, por lo que es recomendable continuar con este estudio trabajando con muestras recolectadas de la flora y fauna que rodean el habitat de estos árboles.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

V. - A P E N D I C E

(Preparacion de medios y reactivos)

PREPARACION MEDIO STAIB: (24).

Semilla <i>Guizotia abyssinica</i>	50.0 g.
Agar bacteriológico.....	15.0 g.
Cloranfenicol.....	50.0 mg.
Agua destilada.....	1000 ml.

- 1.- Macerar la semilla. Hervirla por 25 minutos en 250 ml. de agua destilada. Filtrar a través de una gasa.
- 2.- Adicionar 15 g. de agar bacteriológico. Aforar a un litro con agua destilada.
- 3.- Esterilizar en autoclave a 121°C. por 15 minutos.
- 4.- Enfriar a 50°C., adicionar el cloranfenicol, mezclar.
- 5.- Vaciar en cajas petri.

PREPARACION MEDIO AGAR DEXTROSA SABOURAUD: (24).

Dextrosa.....	20.0 g.
Peptona.....	10.0 g.
Agar bacteriológico.....	15.0 g.
Agua destilada.....	1000 ml.

- 1.- Pesar 65 g. del agar comercial, agregar 1000 ml. de agua destilada.
- 2.- Disolver por calentamiento.
- 3.- Vaciar en viales aproximadamente 10 a 15 ml.
- 4.- Esterilizar en autoclave a 15 lb. por 15 minutos.
- 5.- Dejar solidificar en el vial (pico de flauta).

PREPARACION DEL MEDIO UREA DE CHISTENSEN: (16).

- 1.- Pesar 29 g. de urea (base deshidratada con indicador rojo de fenol) y disolver en 100 ml. de agua destilada. No calentar la solución, la urea se descompone con el calor.
- 2.- Filtrar por membrana Millipore, diámetro poro 0.45 um.
- 3.- Disolver 15 g. de agar en 1000 ml. de agua destilada, esterilizar en autoclave 15 lb. por 15 min. Enfriar hasta 50°C.
- 4.- Agregar los 100 ml. de base de urea estéril por medios asépticos al agar y a la mezcla acuosa.
- 5.- Distribuir en tubos estériles aproximadamente 3 ml. por tubo.
- 6.- Dejar enfriar. Refrigerar para su conservación.

PREPARACION DEL MEDIO PARA CARBOHIDRATOS: (16).

a) Caldo rojo de fenol, pH=7.4.

Pesar las cantidades como se indica en el frasco (16 g. de caldo rojo de fenol para 1000 ml.). Rehidratar con agua destilada o desmineralizada, agitar hasta disolución. Esterilizar en autoclave a 15 lb. por 15 minutos. Dejar enfriar a 40-50°C.

b) Preparación del Carbohidrato al 1 %.

Agregar directamente el azúcar a la base con la concentración deseada. El carbohidrato es filtrado a través de una membrana millipore con poro 0.45 um. Asépticamente en tubos previamente estériles se les agrega 2ml. del carbohidrato a la solución caldo rojo de fenol por tubo

PREPARACION DEL MEDIO NITRATOS: (16).

a) Agar con nitratos:

Extracto de carne.....3.0 g.
Peptona.....5.0 g.
Nitrato de potasio (KNO₃).....1.0 g.
Agar bacteriológico.....0.4 %
Agua destilada.....1000 ml.

Vaciar en tubos aproximadamente 3 ml. de agar con nitratos, esterilizar en autoclave 15 lb. por 15 minutos. Dejar que solidifique el medio en pico de flauta.

b) Preparación de reactivos:

1.- Solución A:

Alfa-naftilamina.....5.0 g

Acido acético (5N).....1000 ml.

Disolver la alfa-naftilamina en menos de 1000 ml. de ácido acético 5N por medio de un suave calentamiento. Pasar la solución a un matraz volumétrico de un litro y agregar ácido acético 5N c.s.p. 1000 ml. Filtrar la solución a través de papel Whatman No.1. Guardar en frasco de vidrio obscuro a 4°C.

2.- Solución B:

Acido sulfanilico.....8.0 g:

Acido acético (5N).....1000 ml.

Disolver el ácido sulfanilico en menos de 1000 ml. de ácido acético 5N. Traspasar la solución a un matraz volumétrico de un litro y agregar ácido acético 5N c.s.p. 1000 ml. Guardar en un frasco de vidrio de color obscuro a 4°C.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- BARNETT, J. A.; Payne, R. W. and Yarrow, D. 1983. Yeast: Characteristics and Identification; 1ª edn. Editorial Cambridge, University Press.
- 2.- BONIFAZ, A. 1980. Micología Médica; 1ª edn. Editorial Mendez Cervantes.
- 3.- DUFAIT, R.; Velho, R. and De Vroey, C. 1987. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen*; 30, 10, 483.
- 4.- ELLIS, D. H. 1994. Clinical Mycology. The human opportunistic mycoses. 1ª edn. Editorial Pfizer.
- 5.- ELLIS, D. H. and Pfeiffer, T. J. 1990. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Journal of Clinical Microbiology. 28, 7, 1642-1644.
- 6.- ELLIS, D. H. and Pfeiffer, T. J. 1990. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet. 336, 923-925.
- 7.- EVANS, E. G. V. and Richardson M. D. 1991. Medical Mycology a practical Approach; 1ª edn. Editorial Oirl Press.

8.- HERNANDEZ, G. R. 1988. Biotificación de cepas de *Filobasidiella (Cryptococcus) neoformans* y *gattii* aislados a partir de casos clínicos. Lic. Tesis. U.N.A.M. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

9.- JACOBSON, E. S.; Ayers, D. J.; Harrell, A. C. and Nicholas, C. C. 1982. Genetic and phenotypic characterization of capsule mutants of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Bacteriology. 150, 3, 1292-1296.

10.- KEITH, H. E. 1976. Light microscopy of basidiospore, and nuclei in spores and hiphas of *Filobasidiella neoformans (Cryptococcus neoformans)*. Journal Bacteriology. 128, 1, 445-455.

11.- KWON-CHUNG, k. J.; Polacheck, I. and Bennett, J. E. 1981. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). Journal of Clinical Microbiology. 15, 3, 535-537.

12.- KWON-CHUNG, k. J. and Bennett, J. E. 1984. Epidemiologic differences between the two varietied of *Cryptococcus neoformans*. American Journal of Epidemiology. 120, 1, 123-129.

13.- KWON-CHUNG, K. J. and Bennett, J. E. 1992. Medical Mycology. 1ª edn. Editorial Lea & Febiger.

14.- KWON-CHUNG, K. J.; Wickes, B. L.; Booth, J. L.; Vishniac, H. S. and Bennett, J. E. 1987. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Infection and Immunity. 55, 8, 1751-1754.

15.- LAZERA, M. S.; Wanke, B. and Nishikawa, M. M. 1993. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic source in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 31, 449-454.

16.- Mc. FADDIN. 1990. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica; 1ª edn. Editorial Médica Panamericana.

17.- PEREZ, M. J. A.; Vázquez, J. R.; Rodríguez, S. C.; Miranda, M. R.; Romo, G. A. L.; Nader, G. E. 1987. Procedimientos de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. 1ª edn. UNAM Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

18.- PFEIFFER, T. J. and Ellis, D. H. 1991. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. J. Inf. Dis. 163, 929-930.

19.- PFEIFFER, T. J. and Ellis, D. H. 1992. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 30, 407-408.

20.-PFEIFFER, T. J. and Ellis, D. H. 1993. Serotypes of Australian environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 31, 401-404.

21.- POLACHEK, I. and Kwong-Chung, K. J. 1980. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillosporus*. Journal of Bacteriology. 142, 1, 15-20.

22.- RENDON, R. C. J. 1986. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de paloma y gallina. Lic. Tesis U.N.A.M. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

23.- RIPPON, J. W. 1988. Tratado de Micología Médica. 3ª edn. Editorial Interamericana.

24.- SEGUNDO, Z. C. 1991. Manual Teórico Práctico de Micología Médica para la carrera de Q. F. B. (Prácticas y alternativas). Lic. Tesis U.N.A.M. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

- 25.- SHIELD, A. B. and Ajello, L. 1966. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Science. 151, 208-209.
- 26.- STAIB, F.; Seibold, M.; Antweiler, E. and Fröhlich, B. 1989. Staib agar supplemented with a triple antibiotic combination for the detection of *Cryptococcus neoformans* in clinical specimens. Mycoses. 32, 9, 448-454.
- 27.- SWINNE, D.; Bauwens, L. and Desmet, P. 1992. Scientific topics. More information about the natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. Isham Mycoses Newsletter. 60, 4.
- 28.- VUIGT, A. y Kleine, F. D. 1975. Zoonosis. 1st edn. Editorial Acriba.
- 29.- WILSON, D. E.; Bennett, J. E. and Bailey, J. W. 1968. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 820-823.