



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN  
CONEJOS CONTRA EL POLISACÁRIDO CAPSULAR DE  
*Cryptococcus neoformans* Y *Cryptococcus gattii* Y SU  
PURIFICACIÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**PATRICIA NAVA FRUTOS**

**MÉXICO, D.F.**

**2009**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Prof. ABEL GUTIÉRREZ RAMOS  
VOCAL: Prof. MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES  
SECRETARIO: Prof. JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO  
1er. SUPLENTE Prof. MARÍA DEL PILAR GRANADA MACÍAS  
2 °. SUPLENTE Prof. ROSALBA ESQUIVEL COTE

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Investigación Diagnóstica, S.A.  
de C.V. Laboratorio de Reactivos para Diagnóstico y Departamento de  
Micología del Hospital General de México OD.

ASESOR DEL TEMA:

JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO \_\_\_\_\_

SUSTENTANTE:

PATRICIA NAVA FRUTOS \_\_\_\_\_

*Si quieres ser sabio, aprende a interrogar razonablemente, a escuchar con atención, a responder serenamente y a callar cuando no tengas nada que decir.*

*Johann Kaspar Lavater (1741-1801)*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, Rosario (Q.E.P.D.) y José, mis padres, por los valores, educación, apoyo, cariño y paciencia que me han brindado. A mis hermanos Alicia y David, por sus palabras de ánimo para seguir adelante.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química, por haberme dado las herramientas para formarme como profesionista y ser humano.

Al Hospital General de México, por abrirme sus puertas para seguir alimentando mi deseo por aprender.

Al maestro Alexandro Bonifaz, que contribuyó a adquirir el gusto por la Micología. Muchas gracias por haberme brindado la oportunidad y confianza de formar parte de su equipo de trabajo y compartir sus enseñanzas.

Al maestro Abel Gutiérrez, por toda la paciencia, confianza, atención y enseñanzas brindadas y por abrirme las puertas de su empresa para la realización de mi proyecto. Gracias.

A los Q.F.B's Javier Araiza y Marco Antonio por compartir sus experiencias, amistad y enseñanzas.

Al Laboratorista Rosalio Valdez Díaz y al M.V.Z Atonatiu Gómez Martínez por su apoyo en la punción cardíaca a los conejos.

Al Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología, en la Facultad de Medicina, UNAM; por proporcionarme las cepas para realizar mi proyecto.

A mis amigas(o) Erika G, Lorena G, Erik C, Pablo Fernando A, Alma S, prima Erika, Marvin V, Minerva M, Liliana L y al personal del Laboratorio Investigación Diagnóstica: Teresa, Erika, Juan Carlos, Sr. Víctor, biólogo Gerardo y Sr. Arturo por las atenciones, consejos y motivaciones.

Como un pequeño testimonio por el gran apoyo brindado durante momentos difíciles y felices de mi vida, en los cuales he logrado terminar mi carrera profesional, la cual constituye un aliciente para continuar con mi superación.

# ÍNDICE

<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo 2. Generalidades de la criptococosis.</b>	
2.1. Definición.....	9
2.2. Epidemiología y ecología de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> .....	10
2.3. Patogenia.....	12
2.4. Aspectos clínicos.....	15
2.5. Diagnóstico de laboratorio.....	17
2.6. Micología de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> .....	21
2.7. Tratamiento.....	23
<b>Capítulo 3. Objetivos.</b>	
3.1. Objetivo primario.....	24
3.2. Objetivos secundarios.....	24
<b>Capítulo 4. Justificación.....</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo 5. Hipótesis.....</b>	<b>28</b>
<b>Capítulo 6. Metodología.</b>	
6.1. Cultivos de cepas de referencia del género <i>Cryptococcus</i> .....	29
6.2. Modelo biológico.....	30

6.3. Preparación del cultivo para la suspensión madre de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> .....	<b>30</b>
6.4. Inactivación del cultivo para la suspensión madre de <i>C. neoformans</i> : y <i>C. gattii</i> .....	<b>31</b>
6.5. Centrifugación de la suspensión madre de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> .....	<b>32</b>
6.6. Preparación de la suspensión antigénica capsular de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> .....	<b>32</b>
6.7. Inoculación de los conejos con la suspensión antigénica capsular de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> para la producción de anticuerpos policlonales de tipo IgG.....	<b>33</b>
6.8. Sangría de prueba a los conejos para la reacción de aglutinación.....	<b>34</b>
6.9. Reacción de aglutinación en placa.....	<b>35</b>
6.10. Refuerzos aplicados a los conejos.....	<b>35</b>
6.11. Sangría de cosecha a los conejos mediante punción cardíaca.....	<b>36</b>
6.12. Procesamiento de los sueros obtenidos de cada conejo antes del aislamiento de la inmunoglobulina G (IgG).....	<b>36</b>
6.13. Aislamiento de la inmunoglobulina G (IgG) con la técnica Rivanol-Sulfato de amonio del suero no. 1 y 2 obtenido del conejo inoculado con la suspensión antigénica capsular de <i>C. gattii</i> y de <i>C. neoformans</i> respectivamente.....	<b>37</b>
6.14. Preparación de soluciones con partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos contra el polisacárido capsular de <i>C. neoformans</i> y de <i>C. gattii</i> para la determinación del antígeno capsular criptococósico.....	<b>39</b>

6.15. Prueba de aglutinación con partículas de látex en placa para la determinación del antígeno capsular criptococósico.....	40
<b>Capítulo 7. Resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo 8. Discusión y análisis de resultados.....</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 9. Conclusiones.....</b>	<b>48</b>
<b>Capítulo 10. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>49</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>56</b>



## Capítulo 1. Introducción.

La criptococosis es una infección micótica causada por levaduras oportunistas, generalmente afecta de forma inicial a los pulmones diseminándose posteriormente hacia la piel y vísceras; teniendo predilección hacia el Sistema Nervioso Central (SNC). Los dos agentes etiológicos principales son *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* <sup>(1,2)</sup>. Se ha reportado que la principal fuente de infección es a través del guano de palomas y pichones, estas aves actúan como hospederos manteniendo al microorganismo viable <sup>(3,4)</sup>. Las levaduras o las basidiosporas al ser inhaladas o al penetrar a la piel por traumatismos con material contaminado, provocan la manifestación de alguna de las formas clínicas de la enfermedad (pulmonar, meníngea, granulomas criptococales, cutánea, ósea y raramente ocular) <sup>(5)</sup> en pacientes diabéticos, con colagenopatías y con inmunosupresión. La afección hacia el SNC es la más frecuente; por no ser evadida por el sistema inmune puede presentarse meningoencefalitis aguda afectando a un 10% de pacientes con severa inmunosupresión (VIH-SIDA) hasta provocarles la muerte <sup>(6,7)</sup>.

Por lo anterior, es importante que se identifique a *C. neoformans* en los líquidos cefalorraquídeos de manera rápida, en un tiempo menor a su crecimiento en los medios de cultivo convencionales; mediante la detección del antígeno capsular por pruebas inmunocromatográficas o ensayos enzimáticos, cuyo desarrollo implica la obtención de anticuerpos policlonales en conejos contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y *C. gattii* utilizando la técnica con rivanol-sulfato de amonio y la diálisis para su purificación.

## **Capítulo 2. Generalidades de la criptococosis.**

### **2.1. Definición.**

La criptococosis es una micosis de curso agudo o subagudo causada principalmente por dos levaduras capsuladas oportunistas: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Esta micosis afecta a pacientes inmunocomprometidos, reportándose algunos casos, por lo regular relacionados a leucemias, linfomas, en pacientes transplantados, bajo terapia con corticoesteroides y actualmente más del 90% del total de casos se asocian al VIH/SIDA <sup>(8)</sup>. Sin embargo, los resultados obtenidos en un estudio con respecto al curso clínico de criptococosis <sup>(9)</sup> muestran que *C. gattii* está asociada con pacientes inmunocompetentes, quienes presentan síntomas clínicos más severos, provocando un período más prolongado en hospitalización, que en las infecciones causadas por *C. neoformans*. Esta especie y *C. gattii* tienen la capacidad de establecerse en los pulmones después de ser inhaladas e inicialmente producir infección; diseminándose a piel y vísceras e incluso rápidamente hacia Sistema Nervioso Central (SNC) causando meningoencefalitis <sup>(10,11)</sup>, con un pronóstico fatal si no hay tratamiento oportuno.

### **2.2. Epidemiología y ecología de *C. neoformans* y *C. gattii*.**

La criptococosis es una enfermedad cosmopolita. Se ha encontrado que la especie *C. neoformans* presenta dos variedades con mayor distribución:

*neoformans* y *grubii*. La variedad *neoformans* corresponde al serotipo D y un híbrido AD, se distribuye en los climas templados; siendo más común en Europa, observándose casos en pacientes que han recibido tratamiento con corticoesteroides y que presentan lesiones en piel. La variedad *grubii* corresponde al serotipo A y se ha encontrado en todo el mundo en un 99% de las infecciones criptococales en pacientes con VIH; siendo la variedad que más se ha aislado de muestras de líquido cefalorraquídeo <sup>(12)</sup>.

*C. gattii* presenta dos serotipos: B y C. Kwon-Chung & Bennett <sup>(13)</sup> han reportado que el serotipo B predomina en zonas tropicales y subtropicales, incluyendo Australia, Brasil, Hawaii, México (5-10% de los aislamientos), Paraguay, Tailandia, Vietnam, Nepal y África Central; excepto en el Sur de California; donde 11 de 30 casos fueron serotipo C <sup>(13)</sup>. Aunque también esta especie se ha aislado en climas templados como en Europa y Colombia incluyendo como áreas endémicas a Malasia, Nueva Guinea, Venezuela y México. Actualmente, *C. gattii* ha sido identificado en regiones del noroeste del Pacífico (Estados Unidos de América) y responsable del brote secuencial de criptococosis en la isla de Vancouver, Canadá <sup>(12,14)</sup>.

El hábitat de *C. neoformans* comúnmente es el guano de algunas aves como palomas, gallinas, pichones del orden columbiforme (*Columba livia*), pero también del suelo y de madera destruida. Con el descubrimiento de Ellis y Pfeiffer <sup>(15)</sup>, se estableció que dos especies de árboles de eucaliptos: *Eucalyptus camaldulensis* (en Australia) y *Eucalyptus tereticornis* (en Nueva Guinea) corresponden al hábitat de *C. gattii*; al haberse aislado el serotipo B. Al koala, se le puede considerar como vector por presentar la enfermedad en forma natural al alimentarse de estos árboles y por el aislamiento de levaduras

en su materia fecal. Sin embargo, como se reporta en un estudio de Colombia el serotipo menos común (C) fue aislado de árboles de almendras (*Terminalia catappa*)<sup>(1)</sup>. López-Martínez y cols.<sup>(9)</sup>, encontraron tres casos debidos a *C. gattii* en zonas con clima templado (zona metropolitana de la Ciudad de México) en donde hay *Eucalyptus* spp<sup>(9)</sup>.

Se cree que *C. gattii* tiene un comportamiento más agresivo que *C. neoformans*, porque primero infecta a individuos inmunocompetentes; sin embargo, se ha encontrado que los aislamientos del serotipo C de *C. gattii* están implicados en infecciones asociadas a VIH en California, Botswana y Malawi<sup>(12)</sup>. De manera general, se consideran factores predisponentes a este tipo de infección personas que padecen diabetes, desnutrición, leucemias, linfomas, sarcomas, corticoterapia y más aún, en pacientes infectados con VIH/SIDA en donde a nivel mundial resulta ser el factor más importante en el 99% de las infecciones criptococales. Además se ha encontrado que la criptococosis es más frecuente individuos de raza blanca, entre los 30-50 años aunque también se presentan casos de recién nacidos, ancianos y en mujeres pero en pacientes con SIDA predomina en los hombres con un período de incubación indeterminado<sup>(10)</sup>.

### **2.3. Patogenia.**

Generalmente, se ha aceptado que la criptococosis se adquiere por la inhalación de las partículas infecciosas aunque también se han reportado

casos de inoculación directa de éstas sobre piel dañada; generando una criptococosis cutánea. Pero no se han documentado casos de que la transmisión ocurra de humano a humano; ni de un animal al humano <sup>(1)</sup>.

La criptococosis pulmonar se inicia inhalando preferentemente las basidiosporas de *C. neoformans* o de *C. gattii*; debido a que su tamaño, menor a los 3  $\mu\text{m}$ , facilita la penetración dentro de los alvéolos <sup>(12)</sup>.

En pacientes inmunodeprimidos cuya inmunidad celular está afectada, ocurre la diseminación hematológica y linfática; afectando no sólo otros órganos sino también al SNC, iniciándose como una meningitis subaguda. En otros casos, la infección se presenta como meningoencefalitis. Ambas especies de *Cryptococcus* infectan al SNC, aunque las lesiones pulmonares causadas por *C. gattii* son más comunes e invade con mayor frecuencia al parénquima cerebral que *C. neoformans* <sup>(14)</sup>.

Al igual que otros microorganismos, *C. neoformans* y *C. gattii* tienen la capacidad de expresar factores de virulencia adquiriendo el hierro del hospedero y compitiendo por éste; para elaborar dos de sus principales factores: la cápsula polisacáridica y la melanina, como lo menciona Jung WH y cols. <sup>(2)</sup>. El hierro férrico es insoluble a un pH fisiológico en presencia de oxígeno y su reducción a hierro ferroso es esencial para su aprovechamiento. Así que, *C. neoformans* reduce el hierro mediante mecanismos que involucran reductasas férricas en la superficie celular, exportando agentes reductores como el ácido 3-hidroxiantranílico y la melanina en la pared celular <sup>(2)</sup>. *C. neoformans* no sintetiza sideróforos como quelantes férricos específicos y almacén de compuestos de hierro; sino que puede usar el hierro unido a sideróforos secretados por otros microorganismos. Si se emplea el tratamiento

de quelación de hierro con deferoxamina puede potencialmente exacerbar la infección; este fenómeno es exactamente igual a lo que sucede en infecciones por hongos oportunistas mucorales <sup>(16,17)</sup>. También favorecen el desarrollo de la enfermedad: los productos de la vía enzimática de la lacasa (fenoloxidasa), otras enzimas como fosfolipasas, proteasas, superóxido dismutasa y la ureasa, los cambios fenotípicos (generación de cepas con morfología colonial lisa, arrugada y pseudohifal) y el crecimiento de la levadura a temperaturas fisiológicas (37° C).

*C. neoformans* presenta un polisacárido capsular que juega un papel importante en la virulencia de esta levadura; pero además define la especificidad del serotipo. La relación entre la virulencia y el serotipo puede deberse a la estructura química del principal antígeno polisacarídico de su cápsula, la glucuronoxilomanana (GXM). La cápsula influye en la manera en que la respuesta inmune en el hospedero se manifiesta, dependiendo de su tamaño y de su estructura química. Se conoce que *C. neoformans* tiene una pared celular rígida, compuesta principalmente de glucanas, en donde el 88% corresponde al polisacárido capsular (GXM); el cual está constituido por manosa, xilosa, ácido glucurónico y O-acetilo; y en menor cantidad dos carbohidratos como antígenos, galactoxilomanana (GalXM) y manoproteína (MP) en un 12% <sup>(18)</sup>. Si se producen anticuerpos anticriptococales en conejos reaccionarán específicamente con los epítopos localizados sobre las glucuronoxilomananas.

La producción de una gran cápsula polisacáridica influye en la virulencia, ya que en un modelo murino se ha encontrado que mutantes sin cápsula no tienen virulencia. Aunque el tamaño de la cápsula aumenta durante la infección, se

puede inducir *in vitro* por altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y suero. La importancia de la cápsula radica en que protege a *C. neoformans* contra las defensas del huésped <sup>(12)</sup> e inhibe la fagocitosis de la levadura por el tamaño de la cápsula <sup>(18)</sup>.

Otro factor de virulencia es la melanina, un polímero de alto peso molecular; cuyo componente monomérico es la dihidroxifenilalanina (producto de la oxidación de la tirosina) y es referida como melanina DOPA. La melanina es sintetizada por la lacasa cuando están presentes compuestos fenólicos (catecolaminas): como la dopamina, adrenalina y noradrenalina que son sustratos para la síntesis de la melanina y están presentes en el cerebro <sup>(19)</sup>. Tanto *C. neoformans* como *C. gattii* sintetizan melanina durante la infección para protegerse del daño oxidativo causado por el huésped y además, la lacasa disminuye los radicales hidroxilo protegiendo a *C. neoformans* y, tanto su actividad como expresión también está influenciada por el hierro <sup>(12,20)</sup>. La capacidad amortiguadora redox de la melanina aumenta cuando ésta se une al hierro ferroso y ayuda a resistir la muerte oxidativa.

Sin embargo, otro de los mecanismos por los cuales *C. neoformans* adquiere ventaja para sobrevivir, es por el cambio fenotípico debido a las diferencias estructurales de la glucuronoxilomanana del polisacárido capsular que le dan la capacidad de resistir la fagocitosis de algunos de sus depredadores en el suelo (amibas y nemátodos como *Acanthamoeba castellanii* y *Caenorhabditis elegans*, respectivamente) <sup>(21)</sup>.

#### **2.4. Aspectos clínicos.**

La criptococosis puede manifestarse en diferentes formas clínicas, aproximadamente el 95% de los casos inician en forma pulmonar, cursando asintómicamente o con síntomas típicos de un resfriado común; sin embargo, excepcionalmente puede evolucionar a casos más graves con hemoptisis a tal grado que puede confundirse con tuberculosis. Con frecuencia una vez que se presenta un foco pulmonar primario, *C. neoformans* afecta al SNC de manera crónica y gradual ocasionando meningitis e iniciándose con cefalea intensa, dolor de órbitas oculares y fiebre constante. Mientras que la meningitis crónica cursa con rigidez y dolor de nuca y positivos los signos de Kerning y Brudzinski. Si el padecimiento se vuelve crónico, el enfermo presenta vómito constante, vértigo, delirio, alucinación, irritabilidad, convulsiones y pérdida temporal de la memoria <sup>(5)</sup>. En algunos casos se presenta fotofobia, estrabismo, diplopía y nistagmo; por la afección neuronal <sup>(5,7,10)</sup>. El padecimiento al ir progresando rápidamente, ocasiona gran pérdida de peso, astenia y adinamia, seguido de coma y muere el paciente por una insuficiencia respiratoria. Conforme la enfermedad va progresando, hay un aumento en los títulos del antígeno; mientras que la disminución de los títulos está asociada a una mejoría clínica. La meningitis criptococal es aun la causa más común de meningitis fúngica en pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) y es la tercera causa más frecuente de complicaciones neurológicas en pacientes con SIDA <sup>(7)</sup>; por lo que la detección del antígeno criptococal constituye una herramienta valiosa en su diagnóstico y pronóstico <sup>(22)</sup>. Incluso, el polisacárido capsular puede inducir que se acumulen fluidos en tejido cerebral y que haya edema, contribuyendo a que el paciente muera. Aunque son formas clínicas raras, la meningoencefalitis afecta principalmente a personas



inmunosuprimidas, presentando todos los síntomas de curso agudo hasta caer en coma, que en un tiempo de 2 a 3 días lo lleva a la muerte <sup>(10)</sup>; aunque también pueden desarrollarse masas fúngicas cerebrales (criptococomas) propiciando convulsiones, náusea; cursando de forma grave hasta la muerte. Los criptococomas en pulmón y en cerebro están más asociados con *C. gattii* que con *C. neoformans*; debido al estado inmunológico del huésped. En pacientes con SIDA, la meningoencefalitis se acompaña casi siempre de cuentas linfocitarias CD4 menores a 100 y hay disminución de leucocitos <sup>(23)</sup>. Si ocurre inoculación de la levadura por un traumatismo en piel, se origina la criptococosis cutánea con lesiones desde pápulo-acneiformes hasta nódulo-linfangíticas en cara, cuello y miembros sobre todo en pacientes con SIDA <sup>(10)</sup>. También la criptococosis puede afectar a huesos largos, generando osteólisis favoreciendo la aparición de fístulas con drenaje de material seropurulento y con artralgias. Cuando se presentan factores predisponentes que favorecen la micosis, el diagnóstico es tardío, el tratamiento inadecuado y hay efectos colaterales; la enfermedad tiende a diseminarse dañando a órganos como hígado, bazo, corazón; generando traumatismos oculares y granulomatoso-gelatinosos <sup>(5)</sup>.

Las infecciones debido a *C. gattii* en algunas ocasiones requiere de terapia antimicótico prolongada y están más asociadas a secuelas neurológicas y frecuentemente, a la intervención neuroquirúrgica que debido a *C. neoformans* <sup>(1)</sup>.

## **2.5. Diagnóstico de laboratorio.**

La toma de la muestra clínica dependerá del tipo de criptococosis a analizar; pueden ser líquido cefalorraquídeo, esputo, aspirado bronquial, orina, fragmentos de biopsia, exudados y suero.

La mayoría de los casos de criptococosis que se diagnostican son meníngeos; siendo el LCR la muestra más importante sobre todo en pacientes con SIDA <sup>(7)</sup>.

Los valores normales en el LCR son de apariencia transparente, 0-5 células/mm<sup>3</sup>, 15- 30mg/100mL de proteínas totales, 10- 30mg/100mL de albúmina, 3-12% de globulinas de las proteínas totales, ausencia de eritrocitos, 50-75mg/dL de glucosa, presión de 50 a 180mm H<sub>2</sub>O y 120- 130mEq/L de cloruros <sup>(24)</sup>. Generalmente, los pacientes con criptococosis y SIDA, presentan en el LCR alteraciones como aumento en la presión intracraneal, linfocitosis, glucosa normal y proteína mayor de 40mg/dL <sup>(7)</sup> mientras que en los casos graves asociados a otros factores hay turbiedad, aumento de densidad y celularidad, con hipogluorraquia e hiperproteorraquia <sup>(8)</sup>.

Se obtiene el diagnóstico de la enfermedad mediante pruebas micológicas e inmunológicas. Para ello, se requieren:

- Examen directo con tinta china: es la prueba más útil y rápida para resaltar la cápsula polisacáridica, con el cuerpo de la levadura en su interior. Consiste en mezclar una gota del fluido (LCR, suero, etc.) previamente centrifugado (5 000rpm durante 5 minutos), más una gota de tinta china entre porta y cubreobjetos; observándose las levaduras solas o con blastoconidios, con núcleos y vacuolas en su interior. En algunos casos es posible observar la aparición de un pseudomicelio rodeado también de halo capsular <sup>(5,8,10)</sup>. La presencia de células polimorfonucleares, gotas de grasa pueden presentar un halo translúcido

que puede simular falsamente la presencia de cápsula. Aunque también, cepas sin cápsula o con reducción en su tamaño son difíciles de observar por este método.

- Frotis y tinciones: a partir de un frotis del material obtenido, se fija al calor, se tiñe con fucsina básica por un minuto, se enjuaga y se coloca un extendido de tinta china; permitiendo observar el cuerpo de la levadura teñido de rojo, la cápsula incolora y traslúcida sobre el fondo de tinta china. Otras tinciones que hacen evidentes la cápsula es la de mucicarmín de Mayer, Hierro coloidal, la del Ácido Peryódico de Schiff (PAS), o la del Papanicolau; aunque estas dos últimas con menor intensidad <sup>(5,8,10,25)</sup>.
- Cultivos: los medios de cultivo que se emplean son agar Sabouraud, agar extracto de levadura, agar infusión- cerebro- corazón (BHI) en el que las colonias crecen a los 2 ó 3 días de incubación a 28° ó 37° C de color blanco amarillentas, algunas veces raramente rosadas, poco elevadas y mucoides por la cápsula <sup>(25)</sup>. No se recomienda el uso de Micosel<sup>®</sup> (agar Sabouraud con antibióticos) debido a que contiene cicloheximida que inhibe su crecimiento. Aunque se puede adicionar cloranfenicol al medio base para eliminar la contaminación por bacterias; en muestras de expectoración o exudados. El agar Níger (Staib-Seeliger) es un medio selectivo comercial que contiene DOPA (dihidroxi-fenilalanina), metabolito también contenido en las semillas de “alpiste negro”; responsable de que las colonias presenten pigmentos de color café-marrón y en ocasiones con tonos verdosos, que se distinguen de otros géneros y especies <sup>(5,8,10,25,26)</sup>.

- Histopatología: Las biopsias son útiles para los casos cutáneos, que ponen en evidencia la reacción inflamatoria, constituida por células gigantes linfocitos y eosinófilos, en donde se localizan levaduras; haciendo uso de tinciones de PAS, hematoxilina-Eosina, Grocott-Gomori o mucicarmín de Mayer <sup>(25)</sup>.
- Pruebas bioquímicas: incluyen la producción de ureasa, realizada en el medio de Christensen a 37° C durante seis horas, considerando que la prueba es positiva cuando hay alcalinización del medio originando un cambio del color original amarillo a rosa o rojo. Todo el género *Cryptococcus* da positiva la prueba, considerando que *Rhodotorula* spp también. Otra prueba positiva para este género es la asimilación de inositol, se realiza incubando la levadura en este medio a temperatura ambiente de 5 a 7 días. También se emplean auxonogramas; aunque el género *Cryptococcus* no fermenta los azúcares <sup>(25)</sup>.
- Pruebas inmunológicas: la determinación del antígeno criptocócico en LCR, suero, orina y aspirados broncoalveolares por aglutinación de partículas de látex revestidas por anticuerpos anticápsula, es la técnica inmunológica más útil, como apoyo al diagnóstico y al manejo terapéutico de los pacientes; que permite poner en evidencia fracciones antigénicas del género *Cryptococcus*, con una sensibilidad muy alta (>90%) <sup>(10,25,27)</sup> aunque pueden generarse falsos positivos por la presencia del factor reumatoide e infecciones producidas por *Trichosporon* sp <sup>(10,25,28-32)</sup>.
- Las técnicas serológicas tradicionales para la detección de anticuerpos circulantes anti-*Cryptococcus* como la inmunodifusión, la

contraelectroforesis, la reacción de fijación de complemento, la inmunofluorescencia indirecta, no se recomiendan en el diagnóstico por la escasa producción de éstos; y por generarse falsos positivos y negativos los resultados deben correlacionarse con el cultivo y examen directo <sup>(8,10,25)</sup>.

- Inmunoensayos: son pruebas de captura del antígeno (*sandwich*) o inmunocromatográficas en fase sólida donde se fijan los anticuerpos específicos contra la cápsula en la superficie de una matriz y luego se pone en presencia del suero o muestra que contiene el antígeno criptocócico (glucuronoxilomanana o GXM) que se quiere demostrar; una vez que ocurre la reacción antígeno-anticuerpo, se hace un lavado y se agrega un anticuerpo marcado.
- Ensayo enzimático: en esta técnica el anticuerpo se marca con una enzima que puede ser la peroxidasa de rábano (PR) o fosfatasa alcalina (FA), y para revelar la reacción se coloca el sustrato específico para la enzima (ortofenilendiamina (OPD) y el parnitrofenilfosfato, respectivamente) que es modificado por ésta y produce un compuesto coloreado, que hace visible la reacción <sup>(33)</sup>.

## **2.6. Micología de *C. neoformans* y *C. gattii*.**

La levadura capsulada *C. neoformans* es un basidiomiceto que representa a un complejo formado de dos especies: *C. neoformans* variedad *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* variedad *neoformans* (serotipo D) y *Cryptococcus gattii* (serotipo

B y C). Aunque también se ha encontrado un serotipo híbrido, AD. Entre ambas especies hay diferencias genéticas, fisiológicas y reproductivas. *C. neoformans* y *C. gattii* se reproducen asexualmente mediante gemación y por los tipos de conidiogénesis blástica simpodial y blástica fialídica <sup>(34)</sup>; sin embargo, se les ha encontrado un estado teleomorfo o sexuado distinto. El estado teleomorfo de *C. neoformans* corresponde a basidiosporas y se denomina *Filobasidiella neoformans*; para *C. gattii* es *Filobasidiella bacillispora* <sup>(35,36)</sup>.

La clasificación taxonómica de la fase teleomorfa y anamorfa de *Cryptococcus* spp es la siguiente <sup>(10)</sup>:

DIVISIÓN	<i>Basidiomycota</i>
CLASE	<i>Himenomycetes</i>
ORDEN	<i>Tremellales</i>
FAMILIA	<i>Filobasidiaceae</i>
GÉNERO	<i>Filobasidiella</i> (Fase teleomorfa)
ESPECIE	<i>neoformans</i>
ESPECIE	<i>bacillospora</i>
GÉNERO	<i>Cryptococcus</i> (Fase anamorfa)
ESPECIE	<i>C. neoformans</i> variedad <i>neoformans</i>
	<i>C. neoformans</i> variedad <i>grubii</i>
	<i>C. gattii</i>

*C. neoformans* y *C. gattii* crecen de 2 a 3 días a 28 o 37° C y a un pH de 4- 7.5, en medios de agar Sabouraud, agar extracto de levadura, agar BHI, sin

cicloheximida por ser un inhibidor de estas levaduras; aunque Sorell <sup>(1)</sup> reporta que *C. gattii* es resistente a la cicloheximida (1.6µg/mL) <sup>(1,37)</sup>. Macroscópicamente, no hay diferencias coloniales entre ambas especies, apreciándose colonias limitadas, mucoides, convexas, de color blanco amarillento. El medio de Staib o de semilla de alpiste negro (*Guizotia abyssinica*) contiene DOPA (dihidroxi-fenilalanina); compuesto que permite observar a las colonias pigmentadas de marrón oscuro o negras por la acción de la enzima fenoloxidasa que transforma los derivados de la DOPA en pigmentos melanoideos <sup>(27)</sup>.

El perfil bioquímico de los carbohidratos para *C. neoformans* y *C. gattii* incluye: la asimilación de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, trealosa y ramnosa.

*C. neoformans* es una levadura de 2 a 7µm de diámetro, pero por la presencia de su cápsula alcanza un diámetro total hasta de 20 µm <sup>(25)</sup>. Puede formar raramente pseudomicelio en tejidos a severas elevaciones de temperatura (38 a 42° C); afectando la división celular de la levadura <sup>(27)</sup> y microscópicamente es muy similar a *C. gattii*; éste difiere de *C. neoformans* en algunas características fisiológicas, por ejemplo, el primero asimila D-prolina, D-triptofano , L- ácido málico; puede utilizar la creatinina como fuente de nitrógeno y la glicina como fuente de carbono y nitrógeno; además es resistente a la canavanina; a diferencia de *C. neoformans* que inhibe su crecimiento por interrupción en la síntesis de RNA. Bajo este principio, *C. gattii* utiliza la glicina en el medio agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) como única fuente de carbono y nitrógeno; degradando la glicina con producción de amoníaco, alcalinizando el medio y dándole una coloración azul

(27,38). Otra diferencia es que *C. neoformans* es ureasa positiva en medios quelantes (EDTA) y *C. gattii* no.

Ocasionalmente algunas especies de *Cryptococcus* como *C. albidus*, *C. laurentii* y rara vez *C. uniguttulatus* son oportunistas y pueden causar criptococosis.

## **2.7. Tratamiento.**

El tratamiento de elección consiste en la administración de anfotericina B, por vía intravenosa a una dosis de 5-25mg cada tercer día, administrándola de forma intrahospitalaria y monitoreando el funcionamiento renal por la nefrotoxicidad (5,7). Aunque también, la administración por vía oral de 5-fluorocitosina (5FC) a una dosis de 150mg/Kg/día o bien, la combinación de anfotericina B más 5 FC, o mejor aún anfotericina B más fluconazol han permitido obtener buenos resultados (22,39).

Para los casos pulmonares o cutáneos se administra ketoconazol (400mg/día) o itraconazol (200mg/día) y para casos meníngeos, fluconazol por vía oral a una dosis de 50-150mg/día; ya que puede atravesar la barrera hematoencefálica con una adecuada concentración en el LCR.

## **Capítulo 3. Objetivos.**

### **3.1. Objetivo primario.**



Obtención de anticuerpos policlonales de tipo IgG producidos en conejos blancos machos de la raza Nueva Zelanda y **Capítulo 2. Generalidades de la criptococosis.**

### **2.1. Definición.**

La criptococosis es una micosis de curso agudo o subagudo causada principalmente por dos levaduras capsuladas oportunistas: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Esta micosis afecta a pacientes inmunocomprometidos, reportándose algunos casos, por lo regular relacionados a leucemias, linfomas, en pacientes transplantados, bajo terapia con corticoesteroides y actualmente más del 90% del total de casos se asocian al VIH/SIDA <sup>(8)</sup>. Sin embargo, los resultados obtenidos en un estudio con respecto al curso clínico de criptococosis <sup>(9)</sup> muestran que *C. gattii* está asociada con pacientes inmunocompetentes, quienes presentan síntomas clínicos más severos, provocando un período más prolongado en hospitalización, que en las infecciones causadas por *C. neoformans*. Esta especie y *C. gattii* tienen la capacidad de establecerse en los pulmones después de ser inhaladas e inicialmente producir infección; diseminándose a piel y vísceras e incluso rápidamente hacia Sistema Nervioso Central (SNC) causando meningoencefalitis <sup>(10,11)</sup>, con un pronóstico fatal si no hay tratamiento oportuno.

### **2.2. Epidemiología y ecología de *C. neoformans* y *C. gattii*.**

La criptococosis es una enfermedad cosmopolita. Se ha encontrado que la especie *C. neoformans* presenta dos variedades con mayor distribución: *neoformans* y *grubii*. La variedad *neoformans* corresponde al serotipo D y un híbrido AD, se distribuye en los climas templados; siendo más común en Europa, observándose casos en pacientes que han recibido tratamiento con corticoesteroides y que presentan lesiones en piel. La variedad *grubii* corresponde al serotipo A y se ha encontrado en todo el mundo en un 99% de las infecciones criptococales en pacientes con VIH; siendo la variedad que más se ha aislado de muestras de líquido cefalorraquídeo <sup>(12)</sup>.

*C. gattii* presenta dos serotipos: B y C. Kwon-Chung & Bennett <sup>(13)</sup> han reportado que el serotipo B predomina en zonas tropicales y subtropicales, incluyendo Australia, Brasil, Hawaii, México (5-10% de los aislamientos), Paraguay, Tailandia, Vietnam, Nepal y África Central; excepto en el Sur de California; donde 11 de 30 casos fueron serotipo C <sup>(13)</sup>. Aunque también esta especie se ha aislado en climas templados como en Europa y Colombia incluyendo como áreas endémicas a Malasia, Nueva Guinea, Venezuela y México. Actualmente, *C. gattii* ha sido identificado en regiones del noroeste del Pacífico (Estados Unidos de América) y responsable del brote secuencial de criptococosis en la isla de Vancouver, Canadá <sup>(12,14)</sup>.

El hábitat de *C. neoformans* comúnmente es el guano de algunas aves como palomas, gallinas, pichones del orden columbiforme (*Columba livia*), pero también del suelo y de madera destruida. Con el descubrimiento de Ellis y Pfeiffer <sup>(15)</sup>, se estableció que dos especies de árboles de eucaliptos: *Eucalyptus camaldulensis* (en Australia) y *Eucalyptus tereticornis* (en Nueva Guinea) corresponden al hábitat de *C. gattii*; al haberse aislado el serotipo B. Al

koala, se le puede considerar como vector por presentar la enfermedad en forma natural al alimentarse de estos árboles y por el aislamiento de levaduras en su materia fecal. Sin embargo, como se reporta en un estudio de Colombia el serotipo menos común (C) fue aislado de árboles de almendras (*Terminalia catappa*) <sup>(1)</sup>. López-Martínez y cols. <sup>(9)</sup>, encontraron tres casos debidos a *C. gattii* en zonas con clima templado (zona metropolitana de la Ciudad de México) en donde hay *Eucalyptus* spp <sup>(9)</sup>.

Se cree que *C. gattii* tiene un comportamiento más agresivo que *C. neoformans*, porque primero infecta a individuos inmunocompetentes; sin embargo, se ha encontrado que los aislamientos del serotipo C de *C. gattii* están implicados en infecciones asociadas a VIH en California, Botswana y Malawi <sup>(12)</sup>. De manera general, se consideran factores predisponentes a este tipo de infección personas que padecen diabetes, desnutrición, leucemias, linfomas, sarcomas, corticoterapia y más aún, en pacientes infectados con VIH/SIDA en donde a nivel mundial resulta ser el factor más importante en el 99% de las infecciones criptococales. Además se ha encontrado que la criptococosis es más frecuente individuos de raza blanca, entre los 30-50 años aunque también se presentan casos de recién nacidos, ancianos y en mujeres pero en pacientes con SIDA predomina en los hombres con un período de incubación indeterminado <sup>(10)</sup>.

### **2.3. Patogenia.**

Generalmente, se ha aceptado que la criptococosis se adquiere por la inhalación de las partículas infecciosas aunque también se han reportado casos de inoculación directa de éstas sobre piel dañada; generando una criptococosis cutánea. Pero no se han documentado casos de que la transmisión ocurra de humano a humano; ni de un animal al humano <sup>(1)</sup>.

La criptococosis pulmonar se inicia inhalando preferentemente las basidiosporas de *C. neoformans* o de *C. gattii*; debido a que su tamaño, menor a los 3  $\mu\text{m}$ , facilita la penetración dentro de los alvéolos <sup>(12)</sup>.

En pacientes inmunodeprimidos cuya inmunidad celular está afectada, ocurre la diseminación hematológica y linfática; afectando no sólo otros órganos sino también al SNC, iniciándose como una meningitis subaguda. En otros casos, la infección se presenta como meningoencefalitis. Ambas especies de *Cryptococcus* infectan al SNC, aunque las lesiones pulmonares causadas por *C. gattii* son más comunes e invade con mayor frecuencia al parénquima cerebral que *C. neoformans* <sup>(14)</sup>.

Al igual que otros microorganismos, *C. neoformans* y *C. gattii* tienen la capacidad de expresar factores de virulencia adquiriendo el hierro del hospedero y compitiendo por éste; para elaborar dos de sus principales factores: la cápsula polisacáridica y la melanina, como lo menciona Jung WH y cols. <sup>(2)</sup>. El hierro férrico es insoluble a un pH fisiológico en presencia de oxígeno y su reducción a hierro ferroso es esencial para su aprovechamiento. Así que, *C. neoformans* reduce el hierro mediante mecanismos que involucran reductasas férricas en la superficie celular, exportando agentes reductores como el ácido 3-hidroxiantranílico y la melanina en la pared celular <sup>(2)</sup>. *C. neoformans* no sintetiza sideróforos como quelantes férricos específicos y

almacén de compuestos de hierro; sino que puede usar el hierro unido a sideróforos secretados por otros microorganismos. Si se emplea el tratamiento de quelación de hierro con deferoxamina puede potencialmente exacerbar la infección; este fenómeno es exactamente igual a lo que sucede en infecciones por hongos oportunistas mucorales <sup>(16,17)</sup>. También favorecen el desarrollo de la enfermedad: los productos de la vía enzimática de la lacasa (fenoloxidasas), otras enzimas como fosfolipasas, proteasas, superóxido dismutasa y la ureasa, los cambios fenotípicos (generación de cepas con morfología colonial lisa, arrugada y pseudohifal) y el crecimiento de la levadura a temperaturas fisiológicas (37° C).

*C. neoformans* presenta un polisacárido capsular que juega un papel importante en la virulencia de esta levadura; pero además define la especificidad del serotipo. La relación entre la virulencia y el serotipo puede deberse a la estructura química del principal antígeno polisacárido de su cápsula, la glucuronoxilomanana (GXM). La cápsula influye en la manera en que la respuesta inmune en el hospedero se manifiesta, dependiendo de su tamaño y de su estructura química. Se conoce que *C. neoformans* tiene una pared celular rígida, compuesta principalmente de glucanas, en donde el 88% corresponde al polisacárido capsular (GXM); el cual está constituido por manosa, xilosa, ácido glucurónico y O-acetilo; y en menor cantidad dos carbohidratos como antígenos, galactoxilomanana (GalXM) y manoproteína (MP) en un 12% <sup>(18)</sup>. Si se producen anticuerpos anticriptococales en conejos reaccionarán específicamente con los epítomos localizados sobre las glucuronoxilomananas.

La producción de una gran cápsula polisacáridica influye en la virulencia, ya que en un modelo murino se ha encontrado que mutantes sin cápsula no tienen virulencia. Aunque el tamaño de la cápsula aumenta durante la infección, se puede inducir *in vitro* por altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y suero. La importancia de la cápsula radica en que protege a *C. neoformans* contra las defensas del huésped <sup>(12)</sup> e inhibe la fagocitosis de la levadura por el tamaño de la cápsula <sup>(18)</sup>.

Otro factor de virulencia es la melanina, un polímero de alto peso molecular; cuyo componente monomérico es la dihidroxifenilalanina (producto de la oxidación de la tirosina) y es referida como melanina DOPA. La melanina es sintetizada por la lacasa cuando están presentes compuestos fenólicos (catecolaminas): como la dopamina, adrenalina y noradrenalina que son sustratos para la síntesis de la melanina y están presentes en el cerebro <sup>(19)</sup>. Tanto *C. neoformans* como *C. gattii* sintetizan melanina durante la infección para protegerse del daño oxidativo causado por el huésped y además, la lacasa disminuye los radicales hidroxilo protegiendo a *C. neoformans* y, tanto su actividad como expresión también está influenciada por el hierro <sup>(12,20)</sup>. La capacidad amortiguadora redox de la melanina aumenta cuando ésta se une al hierro ferroso y ayuda a resistir la muerte oxidativa.

Sin embargo, otro de los mecanismos por los cuales *C. neoformans* adquiere ventaja para sobrevivir, es por el cambio fenotípico debido a las diferencias estructurales de la glucuronoxilomanana del polisacárido capsular que le dan la capacidad de resistir la fagocitosis de algunos de sus depredadores en el suelo (amibas y nemátodos como *Acanthamoeba castellanii* y *Caenorhabditis elegans*, respectivamente) <sup>(21)</sup>.

## 2.4. Aspectos clínicos.

La criptococosis puede manifestarse en diferentes formas clínicas, aproximadamente el 95% de los casos inician en forma pulmonar, cursando asintómicamente o con síntomas típicos de un resfriado común; sin embargo, excepcionalmente puede evolucionar a casos más graves con hemoptisis a tal grado que puede confundirse con tuberculosis. Con frecuencia una vez que se presenta un foco pulmonar primario, *C. neoformans* afecta al SNC de manera crónica y gradual ocasionando meningitis e iniciándose con cefalea intensa, dolor de órbitas oculares y fiebre constante. Mientras que la meningitis crónica cursa con rigidez y dolor de nuca y positivos los signos de Kerning y Brudzinski. Si el padecimiento se vuelve crónico, el enfermo presenta vómito constante, vértigo, delirio, alucinación, irritabilidad, convulsiones y pérdida temporal de la memoria <sup>(5)</sup>. En algunos casos se presenta fotofobia, estrabismo, diplopía y nistagmo; por la afección neuronal <sup>(5,7,10)</sup>. El padecimiento al ir progresando rápidamente, ocasiona gran pérdida de peso, astenia y adinamia, seguido de coma y muere el paciente por una insuficiencia respiratoria. Conforme la enfermedad va progresando, hay un aumento en los títulos del antígeno; mientras que la disminución de los títulos está asociada a una mejoría clínica. La meningitis criptococal es aun la causa más común de meningitis fúngica en pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) y es la tercera causa más frecuente de complicaciones neurológicas en pacientes con SIDA <sup>(7)</sup>; por lo que la detección del antígeno criptococal constituye una herramienta valiosa en su diagnóstico y pronóstico <sup>(22)</sup>. Incluso, el polisacárido

capsular puede inducir que se acumulen fluidos en tejido cerebral y que haya edema, contribuyendo a que el paciente muera. Aunque son formas clínicas raras, la meningoencefalitis afecta principalmente a personas inmunosuprimidas, presentando todos los síntomas de curso agudo hasta caer en coma, que en un tiempo de 2 a 3 días lo lleva a la muerte <sup>(10)</sup>; aunque también pueden desarrollarse masas fúngicas cerebrales (criptocomas) propiciando convulsiones, náusea; cursando de forma grave hasta la muerte. Los criptocomas en pulmón y en cerebro están más asociados con *C. gattii* que con *C. neoformans*; debido al estado inmunológico del huésped. En pacientes con SIDA, la meningoencefalitis se acompaña casi siempre de cuentas linfocitarias CD4 menores a 100 y hay disminución de leucocitos <sup>(23)</sup>. Si ocurre inoculación de la levadura por un traumatismo en piel, se origina la criptococosis cutánea con lesiones desde pápulo-acneiformes hasta nódulo-linfangíticas en cara, cuello y miembros sobre todo en pacientes con SIDA <sup>(10)</sup>. También la criptococosis puede afectar a huesos largos, generando osteólisis favoreciendo la aparición de fístulas con drenaje de material seropurulento y con artralgias. Cuando se presentan factores predisponentes que favorecen la micosis, el diagnóstico es tardío, el tratamiento inadecuado y hay efectos colaterales; la enfermedad tiende a diseminarse dañando a órganos como hígado, bazo, corazón; generando traumatismos oculares y granulomatogelatinosos <sup>(5)</sup>.

Las infecciones debido a *C. gattii* en algunas ocasiones requiere de terapia antimicótico prolongada y están más asociadas a secuelas neurológicas y frecuentemente, a la intervención neuroquirúrgica que debido a *C. neoformans* <sup>(1)</sup>.



## 2.5. Diagnóstico de laboratorio.

La toma de la muestra clínica dependerá del tipo de criptococosis a analizar; pueden ser líquido cefalorraquídeo, esputo, aspirado bronquial, orina, fragmentos de biopsia, exudados y suero.

La mayoría de los casos de criptococosis que se diagnostican son meníngeos; siendo el LCR la muestra más importante sobre todo en pacientes con SIDA <sup>(7)</sup>.

Los valores normales en el LCR son de apariencia transparente, 0-5 células/mm<sup>3</sup>, 15- 30mg/100mL de proteínas totales, 10- 30mg/100mL de albúmina, 3-12% de globulinas de las proteínas totales, ausencia de eritrocitos, 50-75mg/dL de glucosa, presión de 50 a 180mm H<sub>2</sub>O y 120- 130mEq/L de cloruros <sup>(24)</sup>. Generalmente, los pacientes con criptococosis y SIDA, presentan en el LCR alteraciones como aumento en la presión intracraneal, linfocitosis, glucosa normal y proteína mayor de 40mg/dL <sup>(7)</sup> mientras que en los casos graves asociados a otros factores hay turbiedad, aumento de densidad y celularidad, con hipogluorraquia e hiperproteorraquia <sup>(8)</sup>.

Se obtiene el diagnóstico de la enfermedad mediante pruebas micológicas e inmunológicas. Para ello, se requieren:

- Examen directo con tinta china: es la prueba más útil y rápida para resaltar la cápsula polisacáridica, con el cuerpo de la levadura en su interior. Consiste en mezclar una gota del fluido (LCR, suero, etc.) previamente centrifugado (5 000rpm durante 5 minutos), más una gota de tinta china entre porta y cubreobjetos; observándose las levaduras solas o con blastoconidios, con núcleos y vacuolas en su interior. En

algunos casos es posible observar la aparición de un pseudomicelio rodeado también de halo capsular <sup>(5,8,10)</sup>. La presencia de células polimorfonucleares, gotas de grasa pueden presentar un halo translúcido que puede simular falsamente la presencia de cápsula. Aunque también, cepas sin cápsula o con reducción en su tamaño son difíciles de observar por este método.

- Frotis y tinciones: a partir de un frotis del material obtenido, se fija al calor, se tiñe con fucsina básica por un minuto, se enjuaga y se coloca un extendido de tinta china; permitiendo observar el cuerpo de la levadura teñido de rojo, la cápsula incolora y traslúcida sobre el fondo de tinta china. Otras tinciones que hacen evidentes la cápsula es la de mucicarmín de Mayer, Hierro coloidal, la del Ácido Peryódico de Schiff (PAS), o la del Papanicolau; aunque estas dos últimas con menor intensidad <sup>(5,8,10,25)</sup>.
- Cultivos: los medios de cultivo que se emplean son agar Sabouraud, agar extracto de levadura, agar infusión- cerebro- corazón (BHI) en el que las colonias crecen a los 2 ó 3 días de incubación a 28° ó 37° C de color blanco amarillentas, algunas veces raramente rosadas, poco elevadas y mucoides por la cápsula <sup>(25)</sup>. No se recomienda el uso de Micosel<sup>®</sup> (agar Sabouraud con antibióticos) debido a que contiene cicloheximida que inhibe su crecimiento. Aunque se puede adicionar cloranfenicol al medio base para eliminar la contaminación por bacterias; en muestras de expectoración o exudados. El agar Níger (Staib-Seeliger) es un medio selectivo comercial que contiene DOPA (dihidroxi-fenilalanina), metabolito también contenido en las semillas de “alpiste

negro”; responsable de que las colonias presenten pigmentos de color café-marrón y en ocasiones con tonos verdosos, que se distinguen de otros géneros y especies <sup>(5,8,10,25,26)</sup>.

- Histopatología: Las biopsias son útiles para los casos cutáneos, que ponen en evidencia la reacción inflamatoria, constituida por células gigantes linfocitos y eosinófilos, en donde se localizan levaduras; haciendo uso de tinciones de PAS, hematoxilina-Eosina, Grocott-Gomori o mucicarmín de Mayer <sup>(25)</sup>.
- Pruebas bioquímicas: incluyen la producción de ureasa, realizada en el medio de Christensen a 37° C durante seis horas, considerando que la prueba es positiva cuando hay alcalinización del medio originando un cambio del color original amarillo a rosa o rojo. Todo el género *Cryptococcus* da positiva la prueba, considerando que *Rhodotorula* spp también. Otra prueba positiva para este género es la asimilación de inositol, se realiza incubando la levadura en este medio a temperatura ambiente de 5 a 7 días. También se emplean auxonogramas; aunque el género *Cryptococcus* no fermenta los azúcares <sup>(25)</sup>.
- Pruebas inmunológicas: la determinación del antígeno criptococósico en LCR, suero, orina y aspirados broncoalveolares por aglutinación de partículas de látex revestidas por anticuerpos anticápsula, es la técnica inmunológica más útil, como apoyo al diagnóstico y al manejo terapéutico de los pacientes; que permite poner en evidencia fracciones antigénicas del género *Cryptococcus*, con una sensibilidad muy alta (>90%) <sup>(10,25,27)</sup> aunque pueden generarse falsos positivos por la

presencia del factor reumatoide e infecciones producidas por *Trichosporon* sp<sup>(10,25,28-32)</sup>.

- Las técnicas serológicas tradicionales para la detección de anticuerpos circulantes anti-*Cryptococcus* como la inmunodifusión, la contrainmunolectroforesis, la reacción de fijación de complemento, la inmunofluorescencia indirecta, no se recomiendan en el diagnóstico por la escasa producción de éstos; y por generarse falsos positivos y negativos los resultados deben correlacionarse con el cultivo y examen directo<sup>(8,10,25)</sup>.
- Inmunoensayos: son pruebas de captura del antígeno (*sandwich*) o inmunocromatográficas en fase sólida donde se fijan los anticuerpos específicos contra la cápsula en la superficie de una matriz y luego se pone en presencia del suero o muestra que contiene el antígeno criptocócico (glucuronoxilomanana o GXM) que se quiere demostrar; una vez que ocurre la reacción antígeno-anticuerpo, se hace un lavado y se agrega un anticuerpo marcado.
- Ensayo enzimático: en esta técnica el anticuerpo se marca con una enzima que puede ser la peroxidasa de rábano (PR) o fosfatasa alcalina (FA), y para revelar la reacción se coloca el sustrato específico para la enzima (ortofenilendiamina (OPD) y el paranitrofenilfosfato, respectivamente) que es modificado por ésta y produce un compuesto coloreado, que hace visible la reacción<sup>(33)</sup>.

## 2.6. Micología de *C. neoformans* y *C. gattii*.

La levadura capsulada *C. neoformans* es un basidiomiceto que representa a un complejo formado de dos especies: *C. neoformans* variedad *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* variedad *neoformans* (serotipo D) y *Cryptococcus gattii* (serotipo B y C). Aunque también se ha encontrado un serotipo híbrido, AD. Entre ambas especies hay diferencias genéticas, fisiológicas y reproductivas. *C. neoformans* y *C. gattii* se reproducen asexualmente mediante gemación y por los tipos de conidiogénesis blástica simpodial y blástica fialídica <sup>(34)</sup>; sin embargo, se les ha encontrado un estado teleomorfo o sexuado distinto. El estado teleomorfo de *C. neoformans* corresponde a basidiosporas y se denomina *Filobasidiella neoformans*; para *C. gattii* es *Filobasidiella bacillispora* <sup>(35,36)</sup>.

La clasificación taxonómica de la fase teleomorfa y anamorfa de *Cryptococcus* spp es la siguiente <sup>(10)</sup>:

DIVISIÓN	<i>Basidiomycota</i>
CLASE	<i>Himenomycetes</i>
ORDEN	<i>Tremellales</i>
FAMILIA	<i>Filobasidiaceae</i>
GÉNERO	<i>Fillobasidiella</i> (Fase teleomorfa)
ESPECIE	<i>neoformans</i>
ESPECIE	<i>bacillospora</i>
GÉNERO	<i>Cryptococcus</i> (Fase anamorfa)
ESPECIE	<i>C. neoformans</i> variedad <i>neoformans</i>

*C. neoformans* variedad *grubii*

## *C. gattii*

*C. neoformans* y *C. gattii* crecen de 2 a 3 días a 28 o 37° C y a un pH de 4- 7.5, en medios de agar Sabouraud, agar extracto de levadura, agar BHI, sin cicloheximida por ser un inhibidor de estas levaduras; aunque Sorell <sup>(1)</sup> reporta que *C. gattii* es resistente a la cicloheximida (1.6µg/mL) <sup>(1,37)</sup>. Macroscópicamente, no hay diferencias coloniales entre ambas especies, apreciándose colonias limitadas, mucoides, convexas, de color blanco amarillento. El medio de Staib o de semilla de alpiste negro (*Guizotia abyssinica*) contiene DOPA (dihidroxi-fenilalanina); compuesto que permite observar a las colonias pigmentadas de marrón oscuro o negras por la acción de la enzima fenoloxidasa que transforma los derivados de la DOPA en pigmentos melanoides <sup>(27)</sup>.

El perfil bioquímico de los carbohidratos para *C. neoformans* y *C. gattii* incluye: la asimilación de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, trealosa y ramnosa.

*C. neoformans* es una levadura de 2 a 7µm de diámetro, pero por la presencia de su cápsula alcanza un diámetro total hasta de 20 µm <sup>(25)</sup>. Puede formar raramente pseudomicelio en tejidos a severas elevaciones de temperatura (38 a 42° C); afectando la división celular de la levadura <sup>(27)</sup> y microscópicamente es muy similar a *C. gattii*; éste difiere de *C. neoformans* en algunas características fisiológicas, por ejemplo, el primero asimila D-prolina, D-triptofano , L- ácido málico; puede utilizar la creatinina como fuente de nitrógeno y la glicina como fuente de carbono y nitrógeno; además es resistente a la canavanina; a diferencia de *C. neoformans* que inhibe su crecimiento por interrupción en la síntesis de RNA. Bajo este principio, *C. gattii*

utiliza la glicina en el medio agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) como única fuente de carbono y nitrógeno; degradando la glicina con producción de amoníaco, alcalinizando el medio y dándole una coloración azul <sup>(27,38)</sup>. Otra diferencia es que *C. neoformans* es ureasa positiva en medios quelantes (EDTA) y *C. gattii* no.

Ocasionalmente algunas especies de *Cryptococcus* como *C. albidus*, *C. laurentii* y rara vez *C. uniguttulatus* son oportunistas y pueden causar criptococosis.

## **2.7. Tratamiento.**

El tratamiento de elección consiste en la administración de anfotericina B, por vía intravenosa a una dosis de 5-25mg cada tercer día, administrándola de forma intrahospitalaria y monitoreando el funcionamiento renal por la nefrotoxicidad <sup>(5,7)</sup>. Aunque también, la administración por vía oral de 5-fluorocitosina (5FC) a una dosis de 150mg/Kg/día o bien, la combinación de anfotericina B más 5 FC, o mejor aún anfotericina B más fluconazol han permitido obtener buenos resultados <sup>(22,39)</sup>.

Para los casos pulmonares o cutáneos se administra ketoconazol (400mg/día) o itraconazol (200mg/día) y para casos meníngeos, fluconazol por vía oral a una dosis de 50-150mg/día; ya que puede atravesar la barrera hematoencefálica con una adecuada concentración en el LCR.

## **Capítulo 3. Objetivos.**

### **3.1. Objetivo primario.**

Obtención de anticuerpos policlonales de tipo IgG producidos en conejos blancos machos de la raza Nueva Zelanda y su purificación para el desarrollo de pruebas inmunocromatográficas y de ensayos enzimáticos con la finalidad de realizar la detección cualitativa del antígeno capsular de *C. neoformans* y *C. gattii* en líquidos cefalorraquídeos (LCR).

### **3.2. Objetivos secundarios.**

1. Preparar la suspensión madre y la suspensión antigénica capsular de *C. neoformans* y de *C. gattii* para producir anticuerpos policlonales de tipo IgG en conejos blancos machos de la raza Nueva Zelanda.
2. Inocular a conejos blancos machos de la raza Nueva Zelanda con la suspensión antigénica capsular de *C. neoformans* y de *C. gattii*, respectivamente para producir anticuerpos policlonales.
3. Obtener el suero mediante centrifugación diferencial para el aislamiento y purificación de la inmunoglobulina G (IgG) utilizando la técnica con rivanol-sulfato de amonio.



4. Comprobar mediante una prueba de aglutinación con partículas de látex que los anticuerpos policlonales de tipo IgG contenidos en el suero son contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y de *C. gattii*.

## Capítulo 4. Justificación.

En la actualidad, más del 90% de los casos de criptococosis están asociados a infecciones por VIH/SIDA <sup>(5)</sup>; esta enfermedad afecta entre el 6-10% de los pacientes con SIDA y en África puede alcanzar hasta el 30% <sup>(10)</sup>.

La criptococosis presenta diversas variedades clínicas; pulmonar, meníngea, cutánea, ósea, ocular y diseminada <sup>(5,8,10,27)</sup>; sin embargo, la afección comúnmente observada es a nivel del SNC en el paciente con SIDA <sup>(2,7,40-42)</sup>.

Con base a lo anterior, en este trabajo se hará más énfasis a ésta variedad. Actualmente, empleando muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo; se obtiene el diagnóstico de la enfermedad mediante pruebas micológicas e inmunológicas. Para ello, se requiere el examen directo con tinta china para la observación a través del microscopio de las levaduras capsuladas y del aislamiento de *C. neoformans* en medios de cultivo convencionales (medio Staib, medio de semillas de alpiste negro, agar dextrosa Sabouraud sin cicloheximida) durante 2 o 3 días de incubación a 28 o 37 °C <sup>(5,8,26,25)</sup>.

Existen técnicas serológicas como la inmunodifusión, reacción de fijación de complemento, ELISA para la detección de anticuerpos circulantes; pero que al ser escasa su producción y por la presencia de anticuerpos específicos en individuos normales que han estado en contacto con aves, no son recomendables estas técnicas para el diagnóstico; además de que pueden generar resultados falsos positivos y negativos; siendo necesario corroborarse con el cultivo y observación directa <sup>(8,10,25)</sup>. La determinación del antígeno criptococócico en LCR o en suero por aglutinación de partículas de látex

revestidas por anticuerpos anticápsula, es la prueba inmunológica más útil para el diagnóstico, en exámenes de rutina de pacientes VIH positivos; que manifiesten meningitis, neumonía inexplicada o fiebre <sup>(43)</sup> y para el monitoreo terapéutico por titulación <sup>(10,40)</sup> .

Existen pruebas comerciales de aglutinación que utilizan un anticuerpo monoclonal específico para el polisacárido capsular criptocócico; detectan cualitativa y semi-cuantitativamente al polisacárido capsular de *C. neoformans* (glucuronoxilomanana) <sup>(28)</sup>. Estas pruebas se pueden hacer prácticamente en todos los fluidos biológicos (suero, LCR, orina, lavado broncoalveolar), teniendo una sensibilidad muy alta (>90%) <sup>(10,25)</sup>; pero se pueden presentar casos de reactividad cruzada antigénica con el factor reumatoide (eliminado con previo tratamiento de la muestra por quelación con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o con pronasa) <sup>(29-31)</sup> y por algunas infecciones por *Trichosporon sp* <sup>(10,32)</sup> dando aproximadamente un 5% de resultados falsos positivos. Sin embargo, también existen sistemas para la detección del antígeno criptocócico basados en la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos policlonales producidos en conejos <sup>(28)</sup>. El tiempo para hacer el diagnóstico varía aproximadamente alrededor de 30 minutos, ya que los ensayos son rápidos, sensibles, específicos y confiables para la detección del antígeno criptocócico <sup>(28)</sup> .

Debido a la alta frecuencia de casos de criptococosis, que al no ser tratada oportunamente evoluciona a una meningitis aguda e incluso a la muerte; se precisa realizar la detección rápidamente. Con este fin, se pretende desarrollar un método que permita poner en evidencia y en cuestión de minutos, la presencia del antígeno capsular criptocócico en LCR de manera cualitativa y

garantizar el aislamiento del agente etiológico; aunque en el examen directo con tinta china de las muestras de LCR realizado previamente, no se observen levaduras capsuladas.

Otras pruebas que pueden utilizarse para la identificación del antígeno capsular, son aquellas cuyo fundamento se basa en el método de inmunocromatografía en tiras de papel de nitrocelulosa donde se fijan previamente anticuerpos de captura <sup>(44-45)</sup>. En el papel de nitrocelulosa están adsorbidos los anticuerpos policlonales IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y *C. gattii*; que al estar en contacto con la muestra de LCR que contiene el antígeno capsular ocurre la reacción antígeno- anticuerpo. Posteriormente, se añade un segundo anticuerpo anti-gamma globulina (dirigido contra el mismo antígeno) que tiene una enzima conjugada; dando como resultado complejos anticuerpo- enzima sin que se pierda la actividad inmunológica o enzimática <sup>(33,46)</sup>. Finalmente para revelar la reacción, se añade un sustrato específico para la enzima que es modificado por ésta; produciendo un compuesto colorido fácil y sensiblemente detectable, indicando una prueba positiva desde el punto de vista cualitativo. La ventaja de esta técnica es que se realice la identificación de *C. neoformans* y *C. gattii* en LCR de pacientes con probable criptococosis en cuestión de minutos y proceder a dar tratamiento inmediatamente sin esperar el resultado del cultivo. Sin embargo, no se deben excluir las pruebas micológicas para el diagnóstico confiable de criptococosis. Por lo anterior, es la obtención de anticuerpos policlonales de tipo IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y *C. gattii* en conejos y su purificación, una de las primeras etapas para este trabajo.

## Capítulo 5. Hipótesis.

El principal antígeno polisacárido de la cápsula de *C. neoformans* y *C. gattii*, la glucuronoxilomanana (GXM) y sus antígenos somáticos o estructurales; influyen en la virulencia de la levadura. La cápsula es un antígeno de superficie que facilita la supervivencia de la levadura durante la infección. Con la finalidad de obtener anticuerpos policlonales contra el polisacárido capsular, éste antígeno se va a producir masivamente en medios especiales para favorecer la producción de la cápsula. Al ser únicamente el antígeno capsular de interés en este trabajo, para liberarlo de los antígenos somáticos se inactivará a la levadura por métodos químicos. En el suero policlonal que se obtenga de la inmunización de conejos, habrá anticuerpos contra los antígenos capsulares y somáticos; que al ser purificados se aislarán las inmunoglobulinas IgG contra el polisacárido capsular mediante técnicas de precipitación con sales. Se comprobará la obtención de los anticuerpos contra el polisacárido capsular, si se lleva a cabo una reacción de aglutinación entre partículas de látex sensibilizadas con éstos anticuerpos y los antígenos presentes en una suspensión con cantidades masivas de levaduras de *C. neoformans* y *C. gattii*; y más aún con el antígeno capsular presente en LCR de pacientes con criptococosis. Si esto sucede, entonces los anticuerpos policlonales obtenidos podrán ser empleados para el desarrollo de pruebas fundamentadas en la inmunocromatografía o ensayos enzimáticos para la identificación cualitativa o cuantitativa del antígeno capsular de *C. neoformans* y *C. gattii* en muestras de fluidos biológicos (LCR) en pacientes con probable criptococosis.

## Capítulo 6. Metodología.

**6.1. Cultivos de cepas de referencia del género *Cryptococcus*:** la cepa ATCC de *C. neoformans* y la cepa ATCC WM178 de *C. gattii* (apéndice I) fueron obtenidas del Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. A dichas cepas, se les realizaron resiembras en agar infusión de cerebro-corazón (BHI) con un período de incubación de 7 días a 35° C; para favorecer la producción de la cápsula y el crecimiento de la levadura <sup>(47)</sup>. (Figura 1).



Figura 1. Cultivos de *C. neoformans* y de *C. gattii*.

**6.2. Modelo biológico:** para la producción de anticuerpos policlonales de tipo IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* (GXM) y de *C. gattii* se utilizaron conejos blancos machos de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente 2kg de peso bajo condiciones de alimentación *ad limitum* (Figura 2). Al conejo 1, se le inoculó la suspensión antigénica obtenida con el cultivo de *C. gattii*; mientras que al conejo 2, la obtenida con el cultivo de *C. neoformans*. Se eligió el conejo como modelo por su tamaño pequeño, fácil

manejo, por tener un alto nivel inmunitario al producir altos títulos de anticuerpos policlonales <sup>(48-51)</sup>.



Figura 2. Conejos de raza Nueva Zelanda que fueron inoculados.

### 6.3. Preparación del cultivo para la suspensión madre de *C. neoformans* y

*C. gattii*: para verificar la pureza de las cepas utilizadas se les realizaron una tinción de Gram y una tinción con tinta china para verificar cápsula y partiendo de las resiembras en agar infusión de cerebro-corazón (BHI) (apéndice II), se tomó suficiente inóculo con el asa microbiológica (todas las colonias desarrolladas sobre la mitad del agar contenido en una caja Petri). El inóculo fue resuspendido en 8mL de solución salina estéril dentro de un vial; el cual posteriormente fue sellado para resuspender totalmente el cultivo con un vórtex y evitar el derrame de la suspensión. Una vez que se obtuvo la suspensión, se inocularon 7mL de ésta con una jeringa estéril en agar infusión de cerebro-corazón (BHI) preparado dentro de una botella ROUX<sup>®</sup>; hasta que el inóculo fuera absorbido completamente en el agar <sup>(47)</sup>. Finalmente, el cultivo se

mantuvo durante un período de incubación de 5 días a 35° C, favoreciendo su crecimiento <sup>(52)</sup>.

#### **6.4. Inactivación del cultivo para la suspensión madre de *C. neoformans* y**

***C. gattii*:** a cada uno de los cultivos en las botellas, se les adicionaron 90 mL de formalina al 0.5% y se mantuvieron en reposo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, con una varilla de vidrio se desprendió del agar todo el crecimiento de la levadura y se resuspendió en la formalina. Con esta suspensión, se procedió a realizar resiembras en cajas Petri con agar soya tripticaseína y con agar Sabouraud dextrosa para asegurar que ya se inactivó al hongo y que la suspensión no estaba contaminada con bacterias al no haber unidades formadoras de colonias (UFC). Con la formalina se inactivó a la levadura <sup>(47)</sup>, liberándose el antígeno capsular de *C. gattii* y *C. neoformans* y así poder inocular a los conejos con esta suspensión ya inactivada con la presencia de los antígenos capsulares <sup>(53)</sup>. Además, se realizó una tinción de Gram a la suspensión y una tinción con tinta china para corroborar la ausencia de contaminación bacteriana y la presencia de la cápsula polisacáridica, respectivamente.

#### **6.5. Centrifugación de la suspensión madre de *C. neoformans* y *C. gattii*:**

se centrifugó a 3000rpm durante 30 minutos en una centrifuga Beckman<sup>®</sup> a 19° C, para concentrar los antígenos capsulares contenidos en cada suspensión. Una vez obtenido el sedimento de cada suspensión, se realizaron dos lavados de 50mL cada uno con formalina al 0.5% para ser centrifugado nuevamente. Finalmente, ya centrifugado el sedimento se resuspendió por separado en



50mL de formalina al 0.5% para formar cada suspensión; siendo envasadas y cerradas herméticamente en un frasco de vidrio (Figura 3).



Figura 3. Suspensiones madre de *C. neoformans* y *C. gattii* obtenidas.

#### 6.6. Preparación de la suspensión antigénica capsular de *C. neoformans* y

*C. gattii*: cada una de las suspensiones madre se filtraron por gravedad con tela de poro cerrado para eliminar las impurezas residuales del agar después de los lavados.

Se colocó 1mL de cada suspensión filtrada en frascos de vidrio, por separado; a los cuales se les adicionó 50mL de la solución de formalina al 0.5 %, de la que se obtuvo una dilución de cada suspensión con una turbidez equivalente al tubo número 3 en la escala de Mc Farland (conteniendo  $9 \times 10^8$  levaduras/mL aproximadamente) (apéndice III) <sup>(47,54)</sup>.

Se tomó 1mL de la dilución de cada suspensión, colocándose en frascos viales. A estos frascos, le fueron adicionados 1mL del adyuvante incompleto de Freund; agitando constantemente hasta formar una emulsión. El adyuvante fue empleado como estimulante antigénico, para favorecer la producción de altos títulos de anticuerpos sin que se produzcan lesiones en la piel del conejo <sup>(50)</sup>.

**6.7. Inoculación de los conejos con la suspensión antigénica capsular de *C. neoformans* y *C. gattii* para la producción de anticuerpos policlonales de tipo IgG:** posteriormente, se inoculó por vía intramuscular 1mL de la emulsión correspondiente a *C. gattii* en el conejo 1; en tanto que al conejo 2, con la emulsión correspondiente a *C. neoformans*. Los tres sitios de inoculación fueron: uno en la región donde se localizan las placas de Peyer del intestino delgado y dos al nivel de los muslos. Se eligió la región cercana al intestino por encontrarse allí más del 50% del tejido linfoide en el conejo; y dos órganos linfoides análogos a la bolsa de Fabricio en las aves; favoreciendo así la formación más rápida de anticuerpos en el conejo <sup>(50)</sup>.

Las suspensiones se mantuvieron a 4° C hasta el momento de su utilización (Figura 4).

Antes de la inoculación, se verificó que la vacuna adquiriera la temperatura ambiente para evitar molestias en los conejos. Se extrajo con una jeringa para insulina el volumen exacto de la suspensión antigénica capsular de *C. gattii* y *C. neoformans* (tabla 1); la cual fue inoculada por vía subcutánea (entre la piel y el músculo).



Figura 4. Suspensiones antigénicas que fueron inoculadas en los conejos.

Tabla No. 1. Esquema de inmunización para los conejos.

Semana	Volumen (mL) en día martes	Volumen (mL) en día viernes
1	0.1	0.1
2	0.2	0.2
3	0.3	0.3
4	0.4	0.4
5	0.5	0.5
6	0.5	0.5
7	0.5	0.5

**6.8. Sangría de prueba a los conejos para reacción de aglutinación:** en cada conejo se rasuró una de las orejas y se aplicó xileno en la arteria auricular de éstos, para inducir la vasodilatación y facilitar la extracción de sangre <sup>(50)</sup>. Con ayuda de una navaja, se hizo el corte para obtener aproximadamente 1mL de sangre de cada conejo. Una vez extraída la sangre, fue centrifugada a 3000rpm durante 15 minutos para separar el suero del paquete celular. Con el suero, se observó cualitativamente la reacción de aglutinación, determinándose con reacción en placa.

**6.9. Reacción de aglutinación en placa:** en una placa de reacción (vidrio) se colocaron 50 $\mu$ L del suero obtenido del conejo inoculado con la suspensión antigénica capsular de *C. gattii* junto con 50 $\mu$ L de la suspensión madre de *C. gattii*. Ambos volúmenes fueron mezclados, manteniéndose en constante agitación durante cinco minutos; para observar posteriormente sobre una lámpara la reacción de aglutinación. El procedimiento anterior fue repetido con el suero obtenido del conejo inoculado con la suspensión antigénica capsular de *C. neoformans*. Con ambos sueros se observó una aglutinación, pero fue mayor con el obtenido del conejo inoculado con la cepa de *C. neoformans*.

**6.10. Refuerzos aplicados a los conejos:** después de la última inmunización, transcurrieron dos semanas para aplicar refuerzos:

Tabla No. 2. Esquema de refuerzos para los conejos.

Semana	Volumen (mL) en día martes	Volumen (mL) en día viernes
8	0.5	0.5
9	0.5	0.5

**6.11. Sangría de cosecha a los conejos mediante punción cardiaca:** después del último refuerzo y como se obtuvo una franca aglutinación, se dejó transcurrir una semana para hacer la punción cardiaca a cada conejo; siguiendo la metodología:

Se registró el peso de cada conejo para establecer el volumen del anestésico (pentobarbital sódico) a administrar por vía intravenosa; considerando que la dosis fue de 1.4mg/kg de peso. Una vez anestesiado el conejo, fue fijado sobre

una tabla; de tal forma que se mantuvo inmobilizado siendo más sencilla la obtención de la sangre sin causar tanto dolor a los conejos <sup>(50)</sup>. Fueron extraídos 60 mL de sangre a cada uno de los conejos, con una jeringa hipodérmica de 60 mL con aguja No. 18 estéril, conectada a una cánula de polietileno. La sangre fue vertida en vasos de plástico de centrifuga por separado; manteniéndose en reposo hasta su coagulación procurando no agitar para evitar la hemólisis. Se separó el coagulo de las paredes del vaso mediante un aplicador de madera y después se centrifugó a 3000rpm durante 30 minutos; separándose el suero del paquete celular. Finalmente, fueron obtenidos 28mL y 25mL de los sueros correspondientes a los conejos inoculados con las suspensiones antigénicas capsulares de *C. gattii* y *C. neoformans*, respectivamente.

**6.12. Procesamiento de los sueros obtenidos de cada conejo antes del aislamiento de la inmunoglobulina G (IgG):** fue necesaria la adición de 1g de carbón activado a cada suero, para disminuir la cantidad de hemoglobina presente por haberse obtenido un suero hemolizado. Se resuspendieron perfectamente los sueros para ser centrifugados a 2500rpm durante 25 minutos. Finalmente, se decanta el suero desechando la fracción del carbón activado.

**6.13. Aislamiento de la inmunoglobulina G (IgG) con la técnica rivanol-sulfato de amonio del suero no. 1 y 2, obtenido del conejo inoculado con la suspensión antigénica capsular de *C. gattii* y de *C. neoformans* respectivamente:** A un matraz Erlenmeyer de 250mL, con 28mL de suero

(aproximadamente 0.2% de proteína) se le incorporaron 19.3mL de agua destilada y 18.2mL de solución de rivanol al 3% (apéndice IV); considerando que se ajustó la mezcla de reacción a un pH de 7.5, para lo cual fue utilizado HCl al 9%; ya que el pH original fue de 7.89. Ya ajustado el pH, se agitó 30 minutos, se centrifugó a 3000rpm durante 30 minutos para descartar el precipitado amarillo debido al rivanol y sólo se conservó el sobrenadante. El rivanol (lactato de etacridina) a partir de una concentración de 0.4% precipita la mayor parte de las proteínas del suero, excepto las gammaglobulinas que quedan en el líquido sobrenadante <sup>(55)</sup>. En algunos estudios se indica que su tinte básico constituye un complejo electrostático con los grupos cargados negativamente sobre la proteína.

Al sobrenadante, se le adicionaron 3.3g de NaCl para favorecer la precipitación; ya que el rivanol se precipita fácilmente con los iones haluro <sup>(56)</sup>.

Se removió el rivanol mediante filtración por gravedad con un papel filtro de poro abierto; permaneciendo un sedimento amarillo en el papel, correspondiente al rivanol; obteniéndose un volumen de 45mL de suero filtrado (sobrenadante). Posteriormente, se hizo la precipitación con sulfato de amonio al 50% de saturación; esto es, al sobrenadante se le adicionaron 45mL de una solución de sulfato de amonio gota a gota, cuidando que la adición fuera lenta para evitar que se precipiten proteínas indeseables. Los anticuerpos corresponden a la fracción de gammaglobulinas de las proteínas del suero. La solución de sulfato de amonio precipita a la IgG <sup>(55)</sup>.

Se centrifugó a 3000rpm durante 30 minutos para hacer la reprecipitación. Este precipitado contiene toda la  $\gamma$ -globulina, pero contiene trazas de albúmina. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado obtenido en 20mL de

solución salina isotónica. Se precipitó después de haber adicionado 20mL de la solución de sulfato de amonio al 50% de saturación. Finalmente, se eliminó el sulfato de amonio mediante diálisis contra solución salina isotónica al 0.85% como se indica:

Después de haber adicionado la solución de sulfato de amonio, se centrifugó a 3000rpm durante 30 minutos para que el precipitado fuera resuspendido en 15mL de solución salina isotónica. Una vez resuspendido, se colocó la solución dentro de una bolsa de colodión previamente sellada para evitar derrames. La bolsa fue sumergida en un frasco conteniendo 1L de solución salina isotónica al 0.85%; cuya solución era cambiada 2 veces al día, mientras que el frasco se mantenía en refrigeración durante todo el proceso (9 días) <sup>(57)</sup>. La diálisis se realiza con el fin de que el sulfato de amonio remanente en el precipitado sea eliminado <sup>(30)</sup>. Esta técnica se utilizó para eliminar el ion sulfato <sup>(55)</sup>, para concentrar y purificar parcialmente los anticuerpos IgG producidos en el conejo. Una vez finalizada la diálisis, el suero se colocó dentro de un frasco vial, se le adicionó una pizca de azida de sodio como conservador y se mantuvo en congelación hasta su próximo uso.

El procedimiento anterior fue repetido para el aislamiento de IgG del suero no. 2, obtenido del conejo inoculado con la suspensión antigénica capsular de *C. neoformans* realizando modificaciones en las cantidades de reactivos para 25mL de suero (aproximadamente 0.18% de proteína): 17.3mL de agua destilada, 16.3mL de solución de rivanol al 3%, HCl al 9% para el ajuste del pH de 7.77 a 7.5, 2.9g de NaCl y 42mL de sulfato de amonio al 50%.

**6.14. Preparación de soluciones con partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y de *C. gattii* para la determinación del antígeno capsular criptocócico:** en un vaso de precipitados, a la solución A (apéndice V) se le adiciona la solución B que contiene la IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y en otro vaso de precipitados a la solución A se le adiciona la solución B que contiene la IgG contra el polisacárido capsular de *C. gattii* <sup>(30)</sup>. Cada solución se mezcla por separado con agitación durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se adicionan 20µL de albúmina al 30% a cada una de las soluciones para terminar la reacción. Las soluciones fueron almacenadas en refrigeración durante 36 horas, para evitar la precipitación de los reactivos.

Las partículas de látex se utilizaron como soporte para que las IgG fueran adsorbidas pasivamente a éstas y la reacción de aglutinación fuera visible.

**6.15. Prueba de aglutinación con partículas de látex en placa para la determinación del antígeno capsular criptocócico:** en una placa de reacción se colocaron 20µL de la suspensión madre de *C. neoformans* y 20µL de la solución que contiene las partículas de látex sensibilizadas con los anticuerpos policlonales (IgG) producidos en el conejo contra el polisacárido capsular de *C. neoformans*. Ambos volúmenes se mezclaron dando a las reacciones movimientos de rotación suave durante 8 minutos para leer el resultado de la reacción de aglutinación, si es que la hay con iluminación indirecta y sobre fondo oscuro. Una reacción positiva forma acúmulos gruesos de levaduras sobre un fondo claro mientras que una negativa queda homogénea. También se realizó la reacción empleando 20µL de cada una de



las diluciones del suero correspondiente a *C. neoformans* y con 20 $\mu$ L de LCR de pacientes con criptococosis ya diagnosticada. Se realizó el mismo procedimiento empleando 20 $\mu$ L de la suspensión madre de *C. gattii* y 20 $\mu$ L de las diluciones del suero para que reaccionaran con las partículas de látex sensibilizadas con los anticuerpos policlonales (IgG) producidos en el conejo contra el polisacárido capsular de *C. gattii*. Se utilizó un control negativo (20 $\mu$ L de albúmina y solución salina).

## Capítulo 7. Resultados.

Tabla No. 3. Grado de aglutinación en la reacción del antígeno capsular presente en la suspensión madre de *C. neoformans* y de *C. gattii* con las partículas de látex sensibilizadas con los anticuerpos policlonales (IgG) producidos en el conejo contra el polisacárido capsular (pc) de *C. neoformans* y de *C. gattii*, respectivamente. Se observó que la aglutinación fue mayor en el caso de la suspensión madre de *C. neoformans* comparada con la de *C. gattii*.

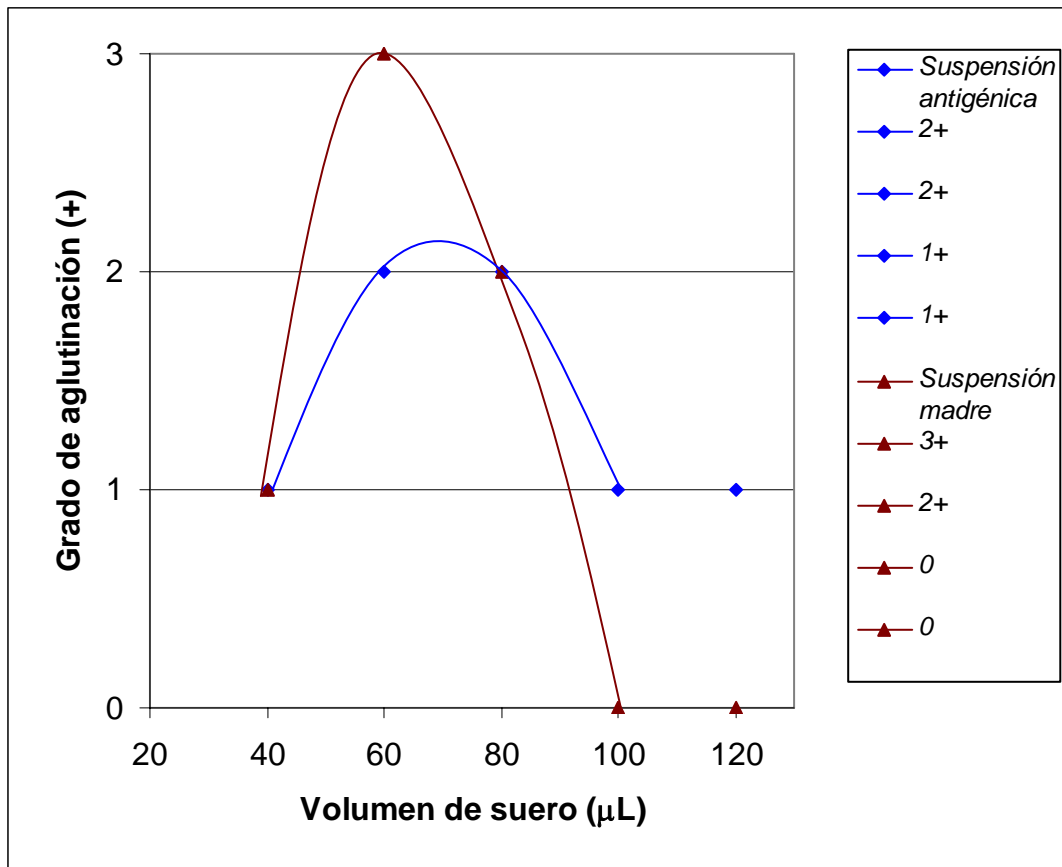
Suspensión madre	Aglutinación en látex con IgG contra pc de <i>C. neoformans</i>	Aglutinación en látex con IgG contra pc de <i>C. gattii</i> .
<i>C. neoformans</i>	4+	0
Control negativo	0	0
<i>C. gattii</i>	0	2+
Control negativo	0	0

Tabla No. 4. Grado de aglutinación en la reacción de las partículas de látex sensibilizadas con los anticuerpos IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* con la suspensión conteniendo como antígeno al polisacárido capsular de *C. neoformans*; además de la aglutinación con la suspensión madre de *C. neoformans*. Se utilizó como control negativo albúmina con solución salina.

Volumen del suero	Suspensión antigénica	Suspensión madre	Control Negativo
120 $\mu$ L	+	0	0

100 $\mu$ L	+	0	0
80 $\mu$ L	2+	2+	0
60 $\mu$ L	2+	3+	0
40 $\mu$ L	+	+	0

Gráfica No. 1. Curva de aglutinación en la reacción de las partículas de látex sensibilizadas con IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* con la suspensión antigénica y madre de *C. neoformans*, respectivamente.



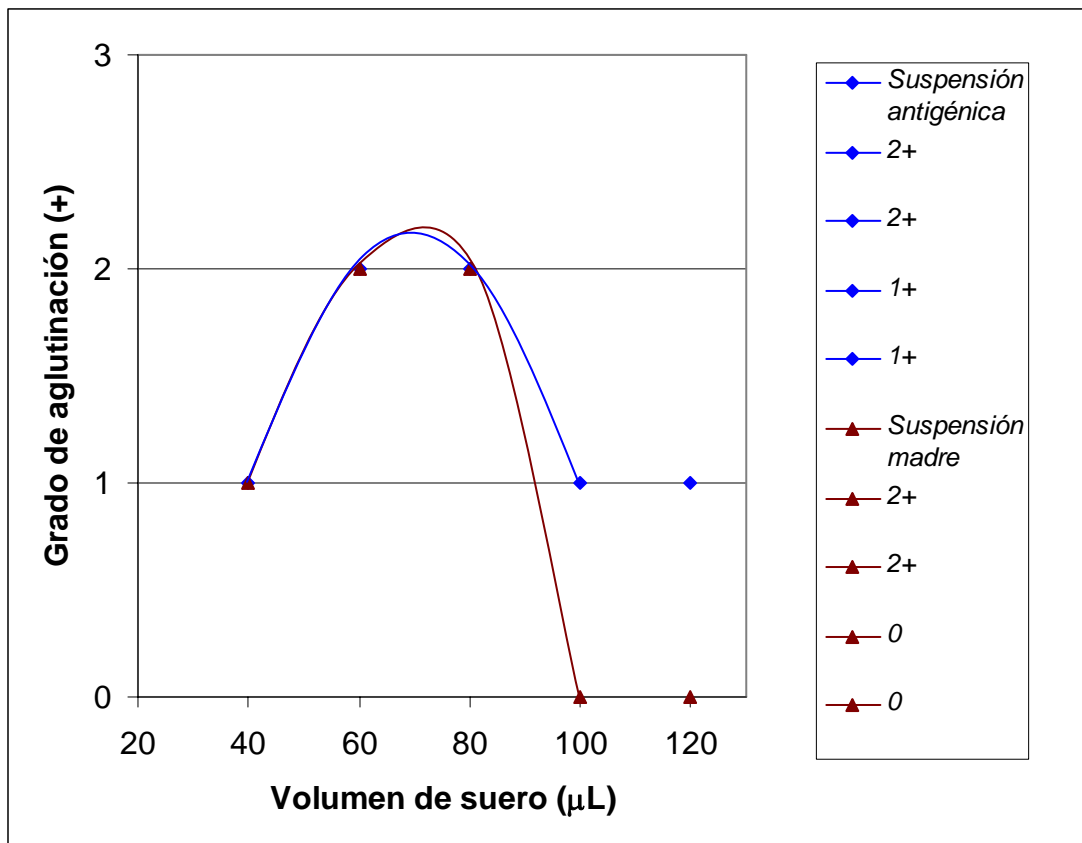
Se observó que la concentración del antígeno capsular de *C. neoformans* contenido en las suspensiones antigénica y madre fue equivalente con la concentración de los anticuerpos policlonales IgG contenidos en las diluciones

del suero, presentándose la zona de equivalencia entre los 60 y 80  $\mu\text{L}$  del suero con aglutinación visible.

Tabla No. 5. Grado de aglutinación en la reacción de las partículas de látex sensibilizadas con los anticuerpos IgG contra el polisacárido capsular de *C. gattii* con la suspensión conteniendo como antígeno al polisacárido capsular de *C. gattii*; además de la aglutinación con la suspensión madre de *C. gattii*. Se utilizó como control negativo albúmina con solución salina.

Volumen del suero	Suspensión antigénica	Suspensión madre	Control Negativo
120 $\mu\text{L}$	+	0	0
100 $\mu\text{L}$	+	0	0
80 $\mu\text{L}$	2+	2+	0
60 $\mu\text{L}$	2+	2+	0
40 $\mu\text{L}$	+	+	0

Gráfica No. 2. Curva de aglutinación en la reacción de las partículas de látex sensibilizadas con IgG contra el polisacárido capsular de *C. gattii* con la suspensión antigénica y madre de *C. gattii*, respectivamente.



Los resultados obtenidos son similares a los de las suspensiones correspondientes a *C. neoformans*, presentándose la zona de equivalencia entre los 60 y 80 µL del suero con aglutinación visible.

Tabla No. 6. Grado de aglutinación en la reacción de las partículas de látex sensibilizadas con los anticuerpos IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y de *C. gattii* con líquidos cefalorraquídeos de pacientes con criptococosis diagnosticada y con líquidos cefalorraquídeos negativos. También se utilizó como control negativo albúmina con solución salina.

Volumen de suero	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>
		LCR (+)	LCR (-)	LCR (+)

80 $\mu$ L	4+	0	3+	0
60 $\mu$ L	3+	0	2+	0
Control Negativo	0	0	0	0

## Capítulo 8. Discusión y análisis de resultados.

A partir de cultivos de cepas de referencia de *C. neoformans* y *C. gattii* se obtuvieron satisfactoriamente las suspensiones madre y antigénica; ésta última utilizada para ser inoculada en los conejos, por contener a las levaduras sin viabilidad pero que mantienen el componente antigénico de interés (polisacárido capsular) para así obtener los anticuerpos policlonales IgG contra el antígeno capsular de dichas levaduras.

Para verificar si el esquema de inmunización aplicado a los conejos había generado producción de anticuerpos como respuesta a la estimulación por el inmunógeno (suspensión antigénica de levaduras), se realizaron reacciones en placa entre el suero obtenido y la suspensión madre correspondiente a cada levadura; encontrándose que el grado de aglutinación provocado por los anticuerpos IgG contra el antígeno capsular de *C. neoformans* fue mayor comparado con el generado por los anticuerpos IgG contra el antígeno capsular de *C. gattii*.

Los resultados mostrados en la tabla no.3 presentaron un comportamiento similar; sugiriendo que esto se deba a los factores antigénicos presentes en *C. neoformans* serotipo D (factores 1, 2, 3 y 8) y en *C. gattii* serotipo B (factores 1, 2, 4 y 5) <sup>(49)</sup>. La especificidad del serotipo está definida por la reacción de los antígenos de superficie expresados sobre células completas de la levadura, con los anticuerpos producidos en conejos contra las células completas no viables de cada uno de los cinco serotipos, selectivamente absorbidos (factor 8) <sup>(1)</sup>. Los anticuerpos contra *C. neoformans* en este suero reaccionan

específicamente con los epítomos localizados sobre el principal polisacárido capsular (glucuronoxilomanana), presentándose de esta forma una mayor aglutinación por la presencia de este factor.

Al hacer reaccionar las diluciones del suero que contienen los anticuerpos policlonales IgG contra el antígeno capsular de *C. neoformans*, con los antígenos presentes en la suspensión antigénica y madre mostraron una máxima aglutinación en la primera y segunda dilución, significando que no hay anticuerpos ni antígenos libres en esta zona. Pero cuando hay tanto exceso de anticuerpos del suero como de antígenos en una suspensión masiva de levaduras durante la reacción no hay aglutinación.

Todos los procedimientos involucrados para la obtención de éstos anticuerpos policlonales fueron importantes; desde trabajar con una cepa de referencia ATCC de *C. neoformans* y *C. gattii*, que fuera sembrada en los medios de cultivo adecuados para que favoreciera un buen desarrollo capsular; permitiendo la expresión de los epítomos antigénicos sobre el glucuronoxilomanana. Además de la inactivación de las cepas para su pérdida de viabilidad, el ajuste de la concentración de las suspensiones comparando su turbidez con la de una suspensión estándar de sulfato de bario; hasta finalmente la purificación de los anticuerpos si se pretende su uso como herramienta en el diagnóstico. Se utilizó la técnica rivanol-sulfato de amonio para el aislamiento de las inmunoglobulinas (IgG) por la capacidad que presenta el rivanol de sedimentar las proteínas del suero (anticuerpos IgM) presentes como respuesta primaria al inmunizar a los conejos; predominando



los de tipo IgG como resultado de estimulaciones inmunogénicas posteriores; proporcionando un sobrenadante rico en inmunoglobulinas IgG <sup>(58)</sup>. Mencionándose que esta técnica fue efectiva para aislar las IgG después de haberse confirmado con las pruebas de aglutinación.

De acuerdo a la hipótesis, se confirmó la producción de anticuerpos policlonales de tipo IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y de *C. gattii*, al haberse observado una franca reacción de aglutinación entre 17 muestras de LCR de pacientes con criptococosis diagnosticada y las diluciones del suero que presentaron una máxima aglutinación con las suspensiones madre de *C. neoformans* y *C. gattii*. Lo anterior establece que los anticuerpos obtenidos contra las dos especies permitieron evidenciar la presencia del antígeno capsular en el LCR; lo cual en un futuro podría repercutir en el desarrollo de pruebas para la identificación de estas levaduras y ayudar en el diagnóstico de la criptococosis.

## Capítulo 9. Conclusiones.

1. A partir de cepas de referencia ATCC de *C. neoformans* y de *C. gattii*, se obtuvieron satisfactoriamente suspensiones antigénicas capsulares que después de haberse inoculado en los conejos, dio como resultado la obtención de sueros contra el polisacárido capsular de estas levaduras.
2. La obtención de los anticuerpos policlonales de tipo IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y *C. gattii* se confirmó mediante reacciones de aglutinación positivas que revelaron la presencia del principal antígeno capsular de estas levaduras en LCR de pacientes con criptococosis.
3. El aislamiento y purificación de la inmunoglobulina G (IgG) utilizando la técnica con rivanol-sulfato de amonio representa una opción fácil y rápida para obtener un producto purificado cuya aplicación sea en la detección cualitativa del antígeno capsular de *C. neoformans* y *C. gattii* en LCR.

## Capítulo 10. Referencias bibliográficas.

1. Sorrell, TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 2001; 39 :155-168.
2. Jung WH, Kronstad JW. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol* 2008; 10: 277-284.
3. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet* 1990; 336: 923-925.
4. Castañón- Olivares LR, López- Martínez R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in México City. *Mycoses* 1994; 37: 325-327.
5. Araiza J, Hernández M, Bonifaz A. Criptococosis. En: Méndez- Tovar LJ, López- Martínez R, Hernández- Hernández F. *Actualidades en Micología Médica*. Cap. 45. Ed. Fac Medicina UNAM, México D.F. 2008; 270-271.
6. Collazos, J. Opportunistic infections of the CNS in patients with AIDS: diagnosis and management. *CNS Drugs* 2003; 17: 869-887.
7. Mamidi A, DeSimone JA, Pomerantz RJ. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol.* 2002; 8: 158-167.
8. Bonifaz A, Flores Romero MP, Araiza J. Criptococosis y su diagnóstico de laboratorio. *Lab-acta* 1996; 8:37-43.
9. López- Martínez R, Soto- Hernández JL, Ostrosky- Zeichner L, et al. *Cryptococcus gattii* among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observations. *Mycopathologia* 1996; 134: 61-64.
10. Bonifaz A. Criptococosis. En: *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez- Cervantes, México D.F. 2000; 332, 334,337-338, 340, 342.

11. Ma H, Croudace JE, Lammas DA, et al. Expulsion of Live Pathogenic Yeast by Macrophages. *Curr Biol* 2006; 16: 2156-2160.
12. Castanón-Olivares LR. Complejo *Cryptococcus neoformans*- *Cryptococcus gattii*. En: Méndez- Tovar LJ, López- Martínez R, Hernández- Hernández F. *Actualidades en Micología Médica*. Cap. 44. Ed. Fac Medicina UNAM, México D.F. 2008; 265.
13. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 123-130.
14. Diaz MR, Fell JW. Use of a suspensión Array for Rapid Identification of the Varieties And Genotypes of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3662-3672.
15. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1642-1644.
16. Jacobson ES, Petro MJ. Extracellular iron chelation in *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 1987; 25: 415-418.
17. Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 62: 316-330.
18. Cherniak R, Sundstrom JB. Polysaccharide Antigens of the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1994; 62:1507-1512.
19. Toriello, C. Mecanismos de patogenicidad en hongos patógenos humanos. En: Méndez- Tovar LJ, López- Martínez R, Hernández- Hernández F. *Actualidades en Micología Médica*. Cap. 9. Ed. Fac Medicina UNAM, México D.F. 2008; 57.

20. Polacheck I, Hearing VJ and Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 1982; 150: 1212-1220.
21. Fries BC, Goldman DL, Cherniak R, et al. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect Immun* 1999; 67: 6076-6083.
22. Lu H, Zhou Y, Yin Y, et al. Cryptococcal Antigen Test Revisited: Significance for Cryptococcal Meningitis Therapy Monitoring in a Tertiary Chinese Hospital. *J Clin Microbiol* 2005; 6: 2989-2990.
23. Arenas R. Criptococosis. En: *Micología Médica Ilustrada*. Nueva Editorial Interamericana, México, D.F. 2002; 235- 240.
24. Trombetta L, Poustis G, Bocassi A, et al. Líquido cefalorraquídeo en pacientes con criptococosis asociada al SIDA. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42: 61-64.
25. López- Martínez R, Méndez- Tóvar LJ, Hernández- Hernández F, et al. Criptococosis. En: *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Ed. Trillas, México, D.F. 2004; 107-111.
26. Shields A, Ajello L. Medium for selective Isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science* 1976; 151:208-209.
27. Perfect, JR, Casadevall A. Human Cryptococcosis. En: *Cryptococcus neoformans* . Ed. ASM Press, Washington DC 1998; 382, 386, 389, 409.
28. Temstet A, Roux P, Poirot JL, et al. Evaluation of monoclonal antibody based latex agglutination test for diagnosis of cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2544-2550.
29. Eng RH, Pearson A. Serum cryptococcal antigen determination in the presence of rheumatoid factor. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 700-702.

30. Bennett JE, Bailey JW. Control for rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. *Am J Clin Pathol* 1971; 58: 360-365.
31. Bonifaz A, González IM. Estudio comparativo mediante pruebas inmunológicas y micológicas de la criptococosis meníngea. *Rev Med Hosp Gral* 1996; 59: 88-92.
32. Mc Manus EJ, Jones JM. Detection of a *Trichosporon beigeli* antigen cross-reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in serum from a patient with disseminated *Trichosporon* infection. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 681-685.
33. James K. Immunoserology of Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 132-152.
34. Castañón- Olivares LR. Reproducción asexual: Conidiogénesis y esporangiosporogénesis. En: Méndez- Tovar LJ, López- Martínez R, Hernández- Hernández F. *Actualidades en Micología Médica*. Cap. 6 Fac Medicina UNAM, México D.F. 2008; 35.
35. Kwon- Chung KJ. Description of a new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 1975; 67: 1197-1200.
36. Kwon- Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. B and C Serotypes. *Mycologia* 1976; 68: 942-946.
37. Fromtling AR, Shadomy HS, Shadomy J, et al. Serotype B/C *Cryptococcus neoformans* Isolated from Patients in Nonendemic Areas. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 408-410.
38. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D)

and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15: 535-537.

39. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2163-2167.

40. Dismukes WE. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1988; 157: 624-628.

41. Sugar A. Overview. Cryptococcosis in the patients with AIDS. *Mycopathologia* 1991; 114: 153-157.

42. Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull* 2005 Apr 18; 72: 99-118.

43. Roux P, Touboul JL, de Chauvin MF, et al. Disseminated cryptococcosis diagnosed in AIDS patient by screening for soluble serum antigens. *Lancet* 1986; 1: 1154.

44. Millipore A. A short guide for developing immunochromatographic test strips (en línea). Fecha de acceso: abril, 2008. URL disponible en: <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/tb500en00>.

45. Hermes EA, Obed HC, Kelly DA. La inmunocromatografía para el diagnóstico de la infección por *Taenia solium* en *Mesocricetus auratus* mediante la detección de coproantígenos. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2001;18: 57-62.

46. Estrada JJ. Diagnóstico por detección de antígenos. *Acta Méd Colomb* 1990; 15:111-115.

47. Illnait ZM, Martínez MG, Fernández AC. Obtención de inmunoglobulina G anti- *Cryptococcus neoformans*. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50: 27-30.

48. Belay T, Cherniak R. Determination of antigen binding specificities of *Cryptococcus neoformans* factor sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 1995; 63:1810-1819.
49. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, et al. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1982; 16:22-29.
50. Hrapkiewicz K, Medina L. Rabbits. En: *Clinical Laboratory Animal Medicine an introduction*. Ed. Blackwell Publishing, USA. 2007; 199, 208.
51. Harkness JE, Wagner JE. Conejo. En: *Biología y clínica de conejos y roedores*. Ed. Acribia, España 1980; 20.
52. Perfect, JR, Casadevall A. Introduction to the pathogen. En: *Cryptococcus neoformans* . Ed. ASM Press, Washington DC 1998; 17.
53. Cherniak R, Morris LC, Anderson BC, et al. Facilitated isolation, purification, and analysis of glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991; 59: 59-64.
54. Dolan CT. Specificity of the latex-cryptococcal antigen test. *Am J Clin Pathol* 1972; 58: 358-364.
55. Barret, TJ. Introducción a la inmunoquímica y la inmunobiología. En: *Inmunología*. Ed. Interamericana, México, D.F 1981; 82.
56. Harrison GR. Differential precipitation of proteins. En: *Protein purification process engineering*. Marcel Dekker, New York, 2000; 158.
57. Freifelder D. Diálisis y filtración molecular. En: *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular*. Ed. Reverté, México, D.F 1981; 168.



58. Díaz E. Evaluación de la prueba de rivanol para el diagnóstico de brucelosis en caprinos (en línea). Fecha de acceso: abril, 2009. URL disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol31-01/RVM31108.pdf>.



Peptona	10 g.
Dextrosa	2 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Fosfato disódico	2.5 g.
Agar bacteriológico	20 g.
Agua	1000 mL.
pH	7.4±0.2

Preparación: Se pesaron 37g del polvo de infusión de cerebro-corazón y fueron colocados dentro de un matraz Erlenmeyer. Se adicionó el agua destilada hasta disolver el polvo, se midió el pH con un potenciómetro, se agregó 20g de agar bacteriológico y se calentó el medio de cultivo agitando constantemente hasta que se disolvió totalmente el agar. Se esterilizó en olla a presión (15lb/in<sup>2</sup> o 1.1kg/cm<sup>2</sup>) a 121° C durante 15 minutos. Se dejó enfriar el medio a una temperatura aproximada de 40° C y finalmente, dentro del área estéril fue vertido el contenido del medio en cajas Petri de plástico o en botellas ROUX<sup>®</sup> con la cantidad suficiente (aproximadamente 310mL) para evitar el derrame del medio con la botella en posición horizontal; obteniéndose 2cm de espesor de agar ya gelificado. Se emplearon las botellas para disminuir el riesgo de contaminación con el hongo patógeno.

**Agar Sabouraud dextrosa** (65g de polvo para preparar 1000mL).

Concentrado enzimático de caseína	10 g.
-----------------------------------	-------

Dextrosa	40	g.
Agar	15	g.
Agua	100	mL.
pH	5.6±0.2	

Preparación: Se pesaron 6.5g del polvo de agar Sabouraud dextrosa y fueron colocados dentro de un matraz Erlenmeyer. Se adicionó 100mL de agua destilada hasta disolver el polvo, se midió el pH con un potenciómetro y se calentó el medio de cultivo agitando constantemente hasta que fue disuelto completamente el polvo. Se esterilizó en olla a presión (15lb/in<sup>2</sup> o 1.1kg/cm<sup>2</sup>) a 121° C durante 15 minutos. Se dejó enfriar el medio a una temperatura aproximada de 40° C y finalmente, dentro del área estéril fue vertido el contenido del medio en cajas Petri de plástico.

**Agar caldo soya tripticaseína** (30g de polvo para preparar 1000mL).

Peptona de caseína	17	g.
Peptona de soya	3	g.
Cloruro de sodio	5	g.
Fosfato dipotásico	2.5	g.
Dextrosa	2.5	g.
Agar bacteriológico	20	g.
Agua	100	mL.
pH	7.3±0.2	

Preparación: Se pesaron 3g del polvo de caldo soya tripticaseína y fueron colocados dentro de un matraz Erlenmeyer. Se adicionó 100mL de agua destilada hasta disolver el polvo, se midió el pH con un potenciómetro, se agregó 2g de agar bacteriológico y se calentó el medio de cultivo agitando constantemente hasta que se disolvió totalmente el agar. Se esterilizó en olla a presión (15lb/in<sup>2</sup> o 1.1kg/cm<sup>2</sup>) a 121° C durante 15 minutos. Se dejó enfriar el medio a una temperatura aproximada de 40° C y finalmente, dentro del área estéril fue vertido el contenido del medio en cajas Petri de plástico.

### **III. Curva de Mc Farland**

Se utiliza para determinar la concentración de suspensiones de bacterias. Se compara la turbidez de la suspensión problema con la de suspensiones estándar de sulfato de bario (resultado de la mezcla de BaCl<sub>2</sub> al 1% y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%), equivalentes a un determinado número de microorganismos.

### **IV. Preparación de solución de rivanol utilizada en el aislamiento de IgG.**

Disolver 3g de monohidrato lactato de 6, 9-Diamino-2-etoxiacridina por cada 100 mL de agua destilada.

### **V. Preparación de reactivos para la prueba de aglutinación con partículas de látex en placa.**

**Solución A.** En un matraz Erlenmeyer se agregaron cada uno de los siguientes reactivos:

Agua destilada	8.2mL
Glicina 0.1M	1.0mL
Azida de sodio al 25%	0.03mL
Látex Stock o látex micronizado	0.6mL

Se mezcló cada uno de los componentes con agitación constante durante 10 minutos.

**Solución B.** En un matraz Erlenmeyer por separado se agregaron las alícuotas del suero conteniendo la IgG contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* y la IgG contra el polisacárido capsular de *C. gattii*; así como las de albúmina al 30% a cada uno; como se indica en la siguiente tabla para preparar las diferentes diluciones.

Tabla No. 7. Volúmenes de alícuotas para preparar la solución B para la prueba de aglutinación con partículas de látex en placa.

	<i>C. neoformans</i>					<i>C. gattii</i>				
Volumen ( $\mu$ L) de suero (IgG)	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Volumen ( $\mu$ L) de albúmina al 30%	60	40	20	0	0	60	40	20	0	0