



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**AISLAMIENTO Y DIFERENCIACION DE  
Cryptococcus neoformans A PARTIR DE  
EXCRETAS DE PALOMAS EN LA  
CIUDAD DE SAN LUIS POTOSI**

**TRABAJO RECEPTACIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
P R E S E N T A :  
RAUL TREJO SANCHEZ**

**ASESOR: Q.F.B. ALICIA ZAVALZA STICKER  
COASESOR: Q.F.B. MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA**

**SAN LUIS POTOSI, S.L.P.**

**1 9 9 2**



T

QR201

.C27

T7

c.1



1080075713



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI**

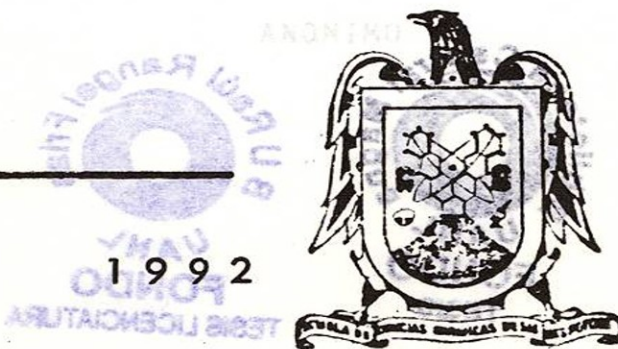
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**AISLAMIENTO Y DIFERENCIACION DE  
Cryptococcus neoformans A PARTIR DE  
EXCRETAS DE PALOMAS EN LA  
CIUDAD DE SAN LUIS POTOSI**

**TRABAJO RECEPCIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
P R E S E N T A :  
RAUL TREJO SANCHEZ**

**ASESOR: Q.F.B. ALICIA ZAVALZA STICKER  
COASESOR: Q.F.B. MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA**

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.



T  
ARZOL  
R. C. 277  
X



Es mejor preguntar dos veces,  
que perderse en la ignorancia.

ANONIMO

**A mis padres con amor y agradecimiento :**

**Raúl Trejo Montes**

**Rosa María Sánchez de Trejo**

**Que con su ejemplo de honestidad  
y trabajo me impulsan a seguir  
siempre adelante.  
Con mi más grande admiración y  
eterna gratitud.**

**A mis hermanos :**

**Juan Manuel**

**Rosa María**

**Vicenta Margarita**

**Con el deseo de que sigamos unidos  
bajo un solo nombre : FRATERNIDAD**

A mis maestras :

Q.F.B. Alicia Zavalza Stiker

Q.F.B. María Genoveva Alvarez Ojeda

Q.F.B. Blanca Ortiz Saldivar

Q.F.B. Magdalena Castillo

Con admiración y cariño.

Con amor a :

Paty

Por todo el cariño que compartimos  
con sinceridad y respeto.

A todas y cada una de las  
personas que con su sonrisa  
nos ayudaron a la realización  
de este estudio.



AISLAMIENTO Y DIFERENCIACION DE *Cryptococcus neoformans* A PARTIR  
DE EXCRETAS DE PALOMAS EN LA CIUDAD DE SAN LUIS POTOSI

## RESUMEN

La criptococosis es una infección oportunista causada por una levadura capsulada llamada *Cryptococcus neoformans*.

En nuestra ciudad, han sido detectados casos de criptococosis pulmonar y meníngeos en personas de edad variable en el hospital "Ignacio Morones Prieto" con una frecuencia que va en aumento, esto al parecer está directamente relacionado con la elevación de padecimientos predisponentes, en especial aquellos que afectan el sistema inmunológico como el SIDA.

El guano o excreta de las palomas ha sido reportado como la principal fuente de infección en esta enfermedad, por lo que el interés principal del estudio, sería determinar si las palomas que abundan en plazas y sitios públicos de la localidad pudieran constituir una importante fuente de infección.

Se colectaron 160 muestras, con procedimientos estériles, cultivándose estas en medio de niger, después se seleccionaron las colonias sospechosas de ser *C. neoformans*, mediante tinción de tinta china, para posteriormente practicarles pruebas fisiológicas y bioquímicas como:

Termorresistencia a 37°C, Producción de ureasa y Auxonograma a diversos azúcares.

En base a las anteriores pruebas, pudimos identificar en forma precisa, cada especie de Criptococos; obteniendo como resultado final, un 1.48 % de aislamientos de *C. neoformans* y un predominante 46.66 % de *Cryptococcus albidus* en sus variedades *albidus* y *diffluens*, las cuales no son consideradas como patógenas.

## INDICE

I.	OBJETIVOS	1
II.	INTRODUCCION	2
III.	ANTECEDENTES HISTORICOS	3
IV.	ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS	7
V.	ASPECTOS INMUNOLOGICOS	13
VI.	PATOGENIA	17
VII.	ASPECTOS CLINICOS	20
	7.1 CRIPTOCOCOSIS PULMONAR	20
	7.2 CRIPTOCOCOSIS DEL SNC	21
	7.3 CRIPTOCOCOSIS CUTANEA	23
	7.4 CRIPTOCOCOSIS OSEA	24
	7.5 CRIPTOCOCOSIS DISEMINADA	24
VIII.	DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	26
	8.1 EXAMEN DIRECTO Y TINCIONES	26
	8.2 CULTIVO	27
	8.3 SEROLOGIA	28
IX.	TRATAMIENTO	30
X.	METODOLOGIA	32
	10.1 RECOLECCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	32
	10.2 EXAMEN DIRECTO	34
	10.3 PRUEBAS FISIOLOGICAS Y BIOQUIMICAS	34
XI.	RESULTADOS	37
XII.	GRAFICAS	40
XIII.	CONCLUSIONES	50
XIV.	DISCUSION	51
XV.	APENDICE	53
XVI.	BIBLIOGRAFIA	58

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Debido a la falta de antecedentes y para determinar probables focos de infección de criptococosis, se determinará la existencia y porcentaje de *C. neoformans*, en la ciudad de San Luis Potosí a partir de excretas de paloma.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

Obtener una identificación confiable, usando técnicas específicas como el AUXONOGRAMA.

Comparación entre sitios públicos y palomares particulares de los resultados obtenidos.

## INTRODUCCION

Criptococosis es una micosis causada por un hongo levaduriforme oportunista denominado *Cryptococcus neoformans*, se caracteriza por afectar inicialmente pulmones y posteriormente se disemina a piel y vísceras con una clara predilección hacia el sistema nervioso central (SNC), siendo ésta de evolución crónica, subaguda y rara vez aguda.<sup>(1)</sup>

En el paciente inmunodeprimido puede manifestarse como infección diseminada y fulminante, en este grupo de pacientes la infección del SNC es elevada. En EUA, se calculan de 200 a 400 casos de meningitis cerebral por año.<sup>(3)</sup>

La mayor frecuencia se observa en los grupos de edad entre 30 y 60 años con predominio en los varones con una proporción de 3:1. En México se desconocen las características epidemiológicas. La principal fuente de infección son las heces de paloma (*Columba livia*) aunque pueden aislarse de cáscaras, de frutas como el durazno, leche y suelo.<sup>(1,2,3)</sup>

El tratamiento recomendado es a base de Anfotericina B y 5-fluorocitosina, obteniendose mejores resultados con la combinación de ambos fármacos.<sup>(1)</sup>

Los sinónimos fuera de uso de la criptococosis, incluyen blastomicosis europea, torulosis, enfermedad de Busse-Buschke y meningitis torula.<sup>(2,5)</sup>

## ANTECEDENTES HISTORICOS

En la literatura médica el término blastomycosis se ha usado vagamente para designar cualquier infección en la cuál se han encontrado células de levaduras en gemación. La criptococosis en particular, se ha confundido con blastomycosis. En la forma cutánea de criptococosis, los informes más frecuentes venían de Europa, se consideró que era ocasionada por especies diferentes y llegó a conocerse como blastomycosis europea. Estas dudas se resolvieron en 1935, cuando Rhoda Benham diferenció en forma clara la blastomycosis de la criptococosis, demostrando que el tipo cutáneo europeo de criptococosis, era causado por el mismo microorganismo que producía la forma meningítica, de la cuál se informaba más comunmente en América.<sup>(3)</sup>

Busse, patólogo y Buschke, cirujano (Alemania), informaron por separado el aislamiento de una levadura proveniente de la tibia de una mujer de 31 años de edad. En un artículo de 1894, dirigido a la Sociedad Médica de Greifswald, Busse describió los microorganismos como de naturaleza fungal y resistentes al tratamiento con hidróxido de sodio (20%). Los aisló empleando un medio de ciruela y arroz denominándolos "Hefe" (*Saccharomyces*), y utilizó el término *Saccharomycosis hominis* para la enfermedad. Las lesiones fueron descritas como "gomatosas" o "sarcomatosas" y el paciente tenía linfadenopatía y úlceras cutáneas.<sup>(1,2,3,17)</sup>

Busse consideró esta levadura como la causa de su enfermedad, más tarde algunos autores usaron el nombre *neoformans* (causante de cáncer o de tumor) como epíteto (adjetivo) para el microorganismo. Un año después, Bushke también describió el caso y el microorganismo. El estaba enterado del trabajo de Busse así que no participó en el descubrimiento del microorganismo. Casi al mismo tiempo, Sanfelice aisló una levadura encapsulada del jugo de durazno, la cual causó lesiones sarcomatosas en animales

infectados de manera experimental. Denominó al microorganismo *Saccharomyces neoformans*, dando así prioridad taxonómica a este epíteto específico. En 1896, Curtis describió un caso similar al de Busse y Buschke. El paciente tenía la levadura en un tumor mixomatoso de la cadera; denominó al microorganismo *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*. Sin embargo, cuando el eminente micólogo francés P. Vuillemin examinó los diversos cultivos no encontró ascosporas, las cuáles son características del género *Saccharomyces* por consiguiente, en 1901, transfirió las levaduras al género *Cryptococcus*, o sea *C. hominis* para los microorganismos aislados por Busse y Curtis, y *C. neoformans* para el aislado de Sanfelice. Para confundir aún más la taxonomía Kützing, había usado antes el género *Cryptococcus* para describir microorganismos blancos parecidos a algas.<sup>(1,2,3)</sup>

En Italia, Sanfelice (1895) había aislado otro microorganismo similar a la levadura de Buschke, esta vez del ganglio linfático de un toro, al cuál lo llamó *Saccharomyces lithogenes*.<sup>(3)</sup> En 1902 Frothingham, aisló el mismo microorganismo de una lesión pulmonar mixomatosa de un caballo en Massachusetts, estos últimos hallazgos establecieron el hecho de que la enfermedad se presenta tanto en el hombre como en los animales. En este mismo año, Weis informó que los microorganismos de Sanfelice, uno aislado por Klein en leche y otro aislado por Plimmer de un paciente con cáncer, eran idénticos en sus características de cultivo. El género propio y el epíteto específico para estos aislados aún tenía que ser establecido.<sup>(1,3,17)</sup>

La relación de la levadura encapsulada con el cáncer, sobre todo con la enfermedad mixomatosa fué observada con anterioridad y pronto se postuló como incitadora de neoplasias.<sup>(3)</sup> Al parecer en 1905, Von Hansemann fue el primero en observar este hongo en un caso de meningitis, describiendo la enfermedad como "tuberculosa", con la levadura presente en "quistes gelatinosos". Fue reconocida

por primera vez ante mortem en 1914, por Verse, en un caso de leptomeningitis en una mujer de 29 años de edad.<sup>(1,3)</sup>

Stoddard y Cutler (1916), describieron las diferencias clínicas y patológicas entre la criptococosis, la blastomicosis y otras micosis. De manera errónea, supusieron que las cápsulas de los microorganismos eran quistes en el tejido, causados por la acción digestiva del hongo ("histolítico") y llamaron al microorganismo *Torula histolitica*. Este nombre no tiene validez ni prioridad, puesto que se basó en una observación errónea; sin embargo se hizo popular y la enfermedad fue conocida durante mucho tiempo como torulosis o meningitis torula.<sup>(2,3)</sup> En un análisis detallado de 26 casos, Baker y Haugen desacreditaron la acción "enzímica" de "torula" y demostraron el efecto compresor sobre los tejidos de las masas capsulares en expansión; también definieron los dos tipos principales de lesiones patológicas: gelatinosa y granulomatosa.<sup>(3)</sup>

Desde la fecha de su descripción inicial y en muchos informes de casos presentados después, la criptococosis fue considerada infección sumamente maligna que por lo general producía la muerte. La mayor parte de estos informes venían de pacientes con enfermedad generalizada, relacionada con cáncer, algún transtorno grave principal o con infección de tipo meningítico, que antes del advenimiento de la Anfotericina B tenía un índice de mortalidad del 80 al 90%.<sup>(3)</sup> A principios de 1950 se inició el reconocimiento de una infección de forma autolimitante. En 1955, Baker y Hagen describieron focos pulmonares en cicatrización en personas sanas. Desde entonces, un criptococoma curado y en ocasiones calcificado, ha venido ha ser un hallazgo incidental en las necropsias sistemáticas.<sup>(3)</sup>

En México en 1955, González Ochoa presentó dos comunicaciones de casos localizados en el cerebro; en 1959, Amado González y Perez Tamayo presentaron un tercer caso de criptococosis generalizada, diagnosticada por necropsia.<sup>(1)</sup>



Los cultivos originales de Busse, Buschke y Curtis fueron incluidos por Benham en un estudio de 27 aislados de criptococos patógenos. Llegando a la conclusión de que sólo existía una especie y sugirió que se conservara el nombre de *C. hominis*.<sup>(3)</sup>

En 1970, Lodder y Kreger Van Rij determinaron la prioridad del nombre *Cryptococcus neoformans*, el cuál sigue siendo aceptado. Asimismo Benham describió cuatro serotipos de *C. neoformans* A, B, C y D, de los cuales hay dos variedades reconocidas: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D), y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C).<sup>(1,2,3)</sup>

Durante muchos años se clasificó a *C. neoformans* como una levadura asporógena en la familia de las criptococáceas de los hongos imperfectos, pero Kwon Chung (1975 y 1976) demostró que el microorganismo tiene dos estados perfectos o telemórficos o sea sexuales, en diferentes serotipos. Las formas perfectas que parecen estar relacionadas con patógenas que producen roya y tizón (invasión de hongos en vegetales), en las plantas superiores fueron llamadas, *Filobasidiella neoformans* que representa el estado telemorfo de *C. neoformans* y *Filodasiella bacillospora* (variedad de *F. neoformans*).<sup>(1,2,3,5,19)</sup>

Cabe mencionar, que algunos autores establecen el nombre de *Leucosporidium neoformans* a la levadura de *C. neoformans*.<sup>(16)</sup>

A pesar de que se informó de que el microorganismo había sido aislado de leche y jugos de frutas (incluyendo un informe erróneo del aislamiento del flujo de mezquite), no se había establecido por completo un hábitat sapróbico, hasta el trabajo de Emmons en 1955, donde informó del aislamiento de microorganismos virulentos de nidos de palomas, gallineros y heces de esas aves. Su relación constante con esos hábitats se ha verificado de manera amplia y se ha registrado el punto de origen de la infección.<sup>(1,2,3)</sup>

En 1956, Littman y Zimmerman publicaron la bibliografía y revisión completas de la enfermedad en una monografía escolar.<sup>(3)</sup>

## ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

Al parecer el pichón (*Columba livia*), es el vector principal de la distribución y conservación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. El microorganismo se aisló en grandes cantidades de la inmundicia y desechos acumulados en los nidos de pichones como áticos de edificios viejos, cúpulas y cornisas donde se ha llegado a obtener hasta en un 69% (Emmons).<sup>(1,2)</sup>

En este ambiente desecado, con frecuencia se encuentra el microorganismo predominante, compartiendo el sustrato alcalino, rico en nitrógeno y sal con *Geotrichum candidum* y unas cuantas especies de *Candida* sp. y *Rhodotorula* sp. Su prevalencia en este nicho ecológico especial, es una situación similar al hábitat ambiental limitado y requerido por *Eoccidioides immitis*. Al parecer, ambos microorganismos son incapaces de sobrevivir o competir con otras especies en distintas situaciones. Los criptococos desaparecen de los desechos infectados cuando estos se mezclan con el suelo; es probable que esto se deba a que hayan sido fagocitados y digeridos por amibas. En forma similar *Eoccidioides immitis* no puede competir cuando la irrigación y cultivo de su hábitat permiten la proliferación de otros hongos.<sup>(3)</sup>

En las áreas rurales también se encuentran Criptococos en sitios habitados por palomas como pajares de establos, desvanes y segadoras de heno. En estos ambientes el polvo contiene microorganismos virulentos viables, en este estado desecado el microorganismo no puede ser mayor de 1µm de diámetro, propiedad que le permite ser inhalado y entrar a los espacios alveolares<sup>(1,3,19)</sup>

Al parecer *C. neoformans*, en muy pocas ocasiones es capaz de infectar palomas, cuya temperatura corporal promedio es de 42°C, no obstante sobrevive cuando pasa a través del intestino, en estas condiciones los microorganismos sobreviven pero no se

desarrollan a 44°C<sup>(1,3)</sup>

La presencia de estas levaduras en las aves se cree que se mantiene de manera similar a la de *H. capsulatum* en los quirópteros, es decir que provoca una infección asintomática en los intestinos, por lo que el guano sale infestado del hongo.<sup>(2)</sup> En la excreta de paloma húmeda o desecada, persiste viable durante dos años o más. En los sitios protegidos que no están en contacto con el suelo, el microorganismo se encuentra en grandes cantidades, y su supervivencia aumenta por el incremento relativo de la humedad. La exposición directa a la luz solar, sobre todo durante los meses de verano, pronto esteriliza los hábitat de Criptococos, sin embargo se mantiene en lugares similares durante el invierno.<sup>(1,2,3,19)</sup>

En los ambientes saprofíticos (como excretas, cáscaras de frutas, etc.) los microorganismos casi no están encapsulados, no obstante esas cepas y mutantes no encapsulados se convierten en virulentos después de la adquisición de la cápsula polisacárida. Al parecer es más importante el potencial que tenga la levadura para generar la cápsula, que el grado de encapsulación, aunque los dos representan un factor de virulencia.<sup>(3)</sup>

En esencia, *Cryptococcus neoformans* es el único agente etiológico de la criptococosis y su período de incubación es indeterminado.<sup>(2,3)</sup> En algunos pacientes en estado de inmunosupresión grave, *C. albidus* y *C. laurentii* se han aislado en raras ocasiones, pero aún no se ha determinado la importancia de estos aislamientos. Krumholz informó acerca de un caso en el cual se aisló *C. albidus*, esta parece ser una infección válida causada por el microorganismo. Los serotipos A y B de *C. neoformans* var. *neoformans* tienen distribución mundial y con frecuencia están relacionados con hábitat aviarios. El serotipo B tiene distribución trópic, mientras que el serotipo C se encuentra principalmente en Norteamérica sobre todo en el sur de California.

Estos son los serotipos relacionados con la variedad *gattii*.<sup>(3,8)</sup> Todos los aislados de esta variedad provienen de infecciones en el hombre o en animales y aún se desconoce el hábitat natural de esta variedad del microorganismo.<sup>(3)</sup>

Aunque se han publicado casos de criptococosis en todos los confines del mundo y en donde existen medios adecuados de laboratorio que auxilien a la clínica, no existe diferencia importante en la frecuencia de la infección que pueda relacionarse con edad, raza u ocupación.<sup>(1,3)</sup>

Respecto a la ocupación se supondría que los trabajadores de establos, gallineros y palomares están más expuestos a *C. neoformans*, e inclusive se les han encontrado títulos altos de anticuerpos específicos, sin embargo la enfermedad no es más frecuente, por que se requiere de factores predisponentes definidos, en especial de severa inmunosupresión, tales como leucemias, linfomas, sarcomas, enfermedad de Hodgkin, corticoterapia, pacientes diabéticos, desnutridos, con colagenopatías o con SIDA.<sup>(2,3)</sup>

Se han informado casos de este padecimiento, desde recién nacidos hasta ancianos, pero la mayor parte de ellos se observan entre los 30 y 60 años de edad y con mayor frecuencia en varones que en mujeres, manteniendo una proporción de 3:1,<sup>(3)</sup> aunque algunos autores mencionan una mayor frecuencia 2:1 en mujeres.<sup>(2)</sup> Esto puede estar en función de la exposición o como se ha sugerido para otras micosis, es cuestión de diferencias hormonales. En resumen, los datos epidemiológicos indican que la criptococosis es infección oportunista, dado que el microorganismo requiere de disminución en las defensas del paciente para establecer la infección.<sup>(1,2,3,17)</sup>

*C. neoformans* var. *neoformans* aislado de los nidos y del guano de las aves, siempre es de los serotipos A y D. Asimismo, dichos serotipos se han encontrado en frutos maduros, verduras podridas, productos lácteos, e incluso una gaita (instrumento

musical).<sup>(3)</sup> Como ya se mencionó desaparecen del suelo en forma rápida debido a que son una "delicia gastronómica" para las especies de *Acanthamoeba*, en consecuencia el nicho ecológico habitado por el microorganismo esta limitado.<sup>(3)</sup> La confusión con respecto a la ecología de los hábitat invadidos por los criptococos, se acrecienta debido a los hallazgos recientes de Kwon Chung y Bennett. En su investigación, el serotipo A es el tipo más común de un hábitat clínico o natural en E.U.A. y corresponde a más del 95% de los microorganismos aislados. El serotipo D es común entre los aislamientos clínicos y naturales en la mayor parte de Europa y otras regiones de clima templado. En el sur de California, 25 de 45 aislamientos en pacientes, mostraban el serotipo C de la variedad *gattii*; el serotipo B se encuentra en las regiones trópicales y subtropicales (sudeste de Asia), estos serotipos (C y B), nunca se han aislado de hábitat natural, por lo tanto todavía debemos encontrar las fuentes naturales de la variedad *gattii*.<sup>(3,6)</sup>

En esencia, existen dos tipos de enfermedad criptocócica, no obstante su manifestación depende de la respuesta de el huésped, más que de la cepa del microorganismo. Por lo regular en el paciente normal la infección que sigue a la inhalación del microorganismo se resuelve en forma rápida con síntomas mínimos y la enfermedad si hay alguna, es subclínica. Normalmente en los líquidos orgánicos se encuentran sustancias inhibitorias del desarrollo de la levadura.<sup>(1,2,3)</sup>

Si el número de microorganismos inhalados es considerable, se puede iniciar infección en los pulmones, con focos de infección ocasionales y transitorios en otros sitios anatómicos; aún cuando la reacción tisular y las defensas celulares sean provocadas con lentitud suelen ser las adecuadas para detener la infección. No es frecuente que en los pacientes normales se establezca infección crónica, la cuál daría origen a brotes ocasionales de afección

generalizada cutánea o meningítica, estos pacientes requieren tratamiento. A menudo, una lesión pulmonar sencilla en un individuo relativamente saludable, se resuelve en forma espontánea o en caso de persistir, con frecuencia es susceptible de intervención quirúrgica seguida de tratamiento farmacológico adecuado.<sup>(3)</sup>

Por lo regular el segundo tipo de enfermedad se relaciona con neoplasias, enfermedades debilitantes y huéspedes expuestos, como resultado del tratamiento con fármacos. En estos casos las defensas del huésped son mínimas e inadecuadas, la enfermedad se extiende con rapidez y afecta a casi todos los órganos, sobre todo al sistema nervioso central. El curso de la infección puede ser, retardado con diseminación lenta de un sistema orgánico a otro o puede ser fulminante o rápidamente mortal. Este tipo clínico de infección fue el primero en ser registrado y durante muchos años fue la única forma reconocida de la enfermedad. En la actualidad, la criptococosis se relaciona sobre todo, con las llamadas enfermedades de la colágena como es, el lupus eritematoso, así como neoplasias, abuso de fármacos y en otros transtornos como uremia, proteinosis alveolar, en pacientes que han recibido algún trasplante de órgano, e inclusive en mujeres embarazadas.<sup>(3)</sup>

En forma reciente, se ha incorporado una nueva categoría de predisposición: SIDA, en estos grupos de alto riesgo el predominio es masculino hasta en una proporción de 4:1. La criptococosis se presenta con mayor incidencia en individuos de raza blanca en una proporción mayor al 80%.<sup>(1,2,3)</sup> La criptococosis es una de las dos infecciones fúngicas oportunistas principales del grupo de pacientes con SIDA. Y si bien la candidosis esofágica y otras formas de candidiásis, son casi universales en los pacientes que sufren esta enfermedad, alrededor del 10% puede manifestar criptococosis que con frecuencia es el primer síntoma de SIDA, destacando el papel de la criptococosis como señal de la enfermedad.<sup>(3)</sup>

Aunque casi siempre la vía de entrada del microorganismo es respiratoria, hay reportes de casos cutáneos primarios que se inician por la inoculación a través de una solución de continuidad (referente a tejido) *C. neoformans*, también puede ingresar por vía oral (frutos y leche), pero la lisozima salival y el pH ácido del estómago lo inactivan la mayoría de las veces.<sup>(2)</sup>

Como en el caso de otras micosis generalizadas, la forma subclínica o ligera de la criptococosis en el paciente no expuesto, solo se ha reconocido relativamente hace poco tiempo, no obstante a diferencia de otras enfermedades fúngicas, ha sido imposible estimar la frecuencia de casos de infección subclínica, debido a que aún no se dispone de pruebas inmunológicas sensibles y confiables en un 100%.<sup>(1,2,3)</sup>

Esa forma subclínica tan ligera ocurre en forma común y es atestiguada mediante el hallazgo frecuente incidental de granuloma criptococócico de vieja fecha, curado, en las necropsias sistemáticas. Es frecuente aislar *Cryptococcus neoformans*, de esputo, piel y otras áreas expuestas al aire, como flora incidental o como colonizador transitorio.<sup>(3,17)</sup>

Hammerman y colaboradores, aislaron el microorganismo en esputo de 80 pacientes, la enfermedad existente sólo se pudo verificar en 28 de ellos.<sup>(3)</sup>

La estimación actual de la frecuencia de enfermedad criptococócica, varía de 200 a 400 casos de meningitis cerebral por año en Estados Unidos, a 15,000 infecciones respiratorias subclínicas sólo en la ciudad de Nueva York, por lo que se le ha denominado "el gigante que despierta" de las enfermedades fúngicas.<sup>(1,3,4)</sup>

Aunque se reportan un cierto número de casos de criptococosis en E.U.A., la cifra probablemente es falsa, ya que ni en E.U.A., ni en México, se trata de un padecimiento de denuncia obligatoria. En México se desconoce la frecuencia de criptococosis.<sup>(1,3,4)</sup>

## ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Entre las principales micosis profundas, la interacción entre el huésped y *C. neoformans*, es quizá la menos entendida. Un problema hallado en la respuesta inmunitaria ha sido la ausencia de antígenos potentes y específicos para que fueran empleados como herramientas inmunológicas. La mala antigenicidad de *C. neoformans*, puede constituir también un problema práctico para el huésped durante la infección natural.<sup>(4)</sup>

*Cryptococcus neoformans*, es una levadura de 3 a 7 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro, rodeada de una cápsula que puede medir de 1 a 30  $\mu\text{m}$ .<sup>(1,14)</sup>

Las formas pequeñas pueden ser fagocitadas y degradadas. La fagocitosis por macrófagos se lleva a cabo habitualmente y la presencia de anticuerpos IgG específicos son indispensables para ello. Una vez fagocitada la levadura, se unen, el fagosoma que la contiene y un lisosoma, para formar un fagolisosoma en el que se observa degradación de los organelos de la levadura.<sup>(1)</sup>

Experimentos en animales, han demostrado que las cepas mutantes no encapsuladas de criptococo que son fagocitadas con facilidad, son avirulentas para los ratones, mientras las cepas progenitoras encapsuladas son virulentas.<sup>(4)</sup> Al igual que las especies de *Candida*, *Cryptococcus* contiene glucanos en pared celular, estos polímeros de manosa y glucosa, pueden producir anticuerpos protectores susceptibles de formarse en ratones por inmunización con *C. neoformans* no capsulados, vivos o muertos.<sup>(1)</sup>

Las formas mayores con cápsulas grandes, no pueden ser fagocitadas y son eliminadas por mecanismos no fagocíticos.<sup>(1)</sup>

Uno de los mecanismos no fagocíticos, es la FORMACION DE ANILLOS, en este mecanismo participan, polimorfonucleares (PMN) y monocitos, siendo necesaria la presencia de opsoninas como pseudobeta globulinas, anticuerpos y factor C3 de complemento,



además de la acción fungistática del suero. La levadura es inicialmente rodeada de PMN (la unión levadura-PMN requiere de opsoninas), resultando un anillo o roseta, en la que el centro lo ocupa la levadura y alrededor forman una estructura bidimensional los PMN como un anillo. Después de unas horas los PMN son desplazados por monocitos y estos por medio de enzimas como esterasas, fosfatasas y metabolitos oxidativos, degradan a la levadura en un lapso de 3 a 4 días. Este proceso es lento y la actividad fungistática del suero impide que la levadura gema.<sup>(1)</sup>

CITOTOXICIDAD POR CELULAS (Natural Killer) NK, es otro mecanismo no fagocítico, las células NK pueden ejercer citotoxicidad sobre *C. neoformans* y degradarlo en lapso aproximado a 6 horas, ésta puede ser mediada por anticuerpos específicos IgG y en este caso la degradación ocurre en menos tiempo (4 horas aproximadamente). Este mecanismo es altamente eficiente en tejidos, en pulmón la acción de células NK contra *C. neoformans* es mayor que en bazo y aunque esta es muy eficiente, está limitada y por sí sola no elimina la infección.<sup>(1)</sup>

El constituyente patógeno más importante del criptococo identificado hasta la fecha es un polisacárido capsular. El polisacárido capsular contiene un esqueleto de residuos de D-manopiranosido enlazados en la posición  $\alpha$ -1,3 (polímero de manosa, xilosa y ácido glucurónico). Hay 4 tipos serológicos de *C. neoformans* A,B,C,D que pueden diferenciarse por pruebas de aglutinación o anticuerpos fluorescentes con sueros hiperinmunitarios; todos los serotipos son igualmente virulentos. El polisacárido capsular es poco inmunógeno, un problema que se refleja en las dificultades para inmunizar a los animales de laboratorio y la baja cifra de los títulos de anticuerpos en los enfermos con criptococosis.<sup>(1,4)</sup>

El polisacárido capsular produce en general respuesta mínima de anticuerpos humorales en el hombre y animales de

experimentación durante la infección, probablemente por que casi todo el anticuerpo se absorbe por el abundante polisacárido capsular en tejidos, o tal vez por que el polisacárido capsular recubre las proteínas opsónicas que estan unidas a sitios antigénicos en la superficie del hongo, evitando así que sea reconocido por los fagocitos. Es posible que incluso el anticuerpo anticapsular específico, no logre potenciar la fagocitosis si hay polisacárido en exceso, puesto que el anticuerpo opsónico es muy sensible a la neutralización por polisacárido libre. Ya que se ha visto que la adición de polisacárido capsular a los sistemas in vitro, altera la fagocitosis por los leucocitos PMN. Así mismo la inoculación in vivo del polisacárido capsular acorta la supervivencia de los ratones cuando posteriormente son expuestos con criptococos encapsulados.<sup>(1,4)</sup>

Esta actividad de inhibición de fagocitosis por el polisacárido capsular es un mecanismo de sobrevivencia y evasión de *C. neoformans*, siendo específica para él mismo. La opción del huésped es la producción de anticuerpos, opsoninas y complemento, ya que a pesar de la actividad antifagocítica del polisacárido capsular, los ratones forman buenos niveles de anticuerpos si reciben pequeñas dosis de polisacárido junto con adyuvantes o portadores de proteínas, y los conejos producen altos títulos de anticuerpos si están hiperinmunizados.<sup>(1)</sup>

La eficiencia de la fagocitosis es inversamente proporcional al tamaño de la cápsula. Aunque este no incrementa la virulencia, es suficiente la presencia de cápsula para hacer virulenta a la levadura. Otra posible explicación de la respuesta de anticuerpos baja o ausente a *C. neoformans*, es que la cápsula inhibe la inmunorrespuesta.<sup>(1)</sup>

Otros mecanismos de sobrevivencia y evasión de *C. neoformans* son: la inducción de linfocinas supresoras que inhiben la actividad fagocítica de una población de macrófagos de exudado peritoneal en ratones, la estimulación de linfocitos T supresores,

los cuales secretan los factores supresores TF1 y TF2 que inhiben la fase de inducción y la fase efectora de hipersensibilidad retardada respectivamente, y por último el mecanismo de inducción de tolerancia, es decir incapacidad de producir anticuerpos, por lo general acompañada por supresión de producción de anticuerpos por inducción de linfocitos T reguladores.<sup>(1)</sup>

Tanto los anticuerpos como el complemento, parecen ser importantes para potenciar la fagocitosis de los criptococos, por lo tanto, se ha postulado que la opsonización dependiente de los anticuerpos y del complemento puede ser el factor crucial que limita la infección criptocócica en la mayor parte de los tejidos y que la prominencia de la infección del sistema nervioso central puede representar un "escape" de los hongos hacia un medio en el cual los componentes del complemento penetren a un título bajo o simplemente no penetren.<sup>(4)</sup>

## PATOGENIA

Hay dos tipos de criptococosis, cuyas manifestaciones dependen de la respuesta del huésped más que de la cepa de *Cryptococcus*, que a continuación se detallan.

En el primer tipo, la infección se establece en el paciente normal, después de la inhalación del agente por lo general se resuelve en forma rápida con síntomas mínimos si es que los hay y comunmente en forma asintomática, ya que existen en líquidos corporales sustancias que inhiben o degradan a *C. neoformans*, si las defensas del huésped son adecuadas, habitualmente detienen la infección; en unos pocos casos en pacientes normales se establece infección crónica que recidiva en forma ocasional, afectando meninges, piel o en forma diseminada hasta vísceras.<sup>(1)</sup>

El segundo tipo, acompaña a neoplasias, padecimientos debilitantes y huéspedes inmunodeficientes, habitualmente como resultado del tratamiento con fármacos. En estos casos la defensa del huésped es mínima o insuficiente y el padecimiento se disemina rápidamente a casi todo el organismo de manera particular al SNC. El curso de la infección puede extenderse en forma lenta, por diseminación de un órgano a otro o desarrollarse de manera fulminante.<sup>(1)</sup>

Con frecuencia se le ha asignado a la criptococosis el carácter de oportunista, sin embargo sólo en 43% de los casos se han demostrado factores predisponentes. Entre los que se consideran:

- a) Raza: el 87% de los casos se presentan en individuos de raza blanca.
- b) Sexo: la proporción de varones afectados es de tres por una mujer.
- c) Padecimientos: entre estos se mencionan, enfermedad de Hodgkin, linfosarcoma, leucemia, diabetes mellitus y

cirrosis hepática.

d) Tratamiento prolongado con esteroides.

Algunos factores del huésped que intervienen en la respuesta a *Є. neoformans*, pueden ser:

- a) Hormonas, estrógenos y otros esteroides pueden dañar al hongo y promueven la fagocitosis.
- b) Lisozima (enzima contenida en el lisosoma): tiene acción sobre *Є. neoformans*
- c) Factor anticriptocócico: existe en suero normal tiene actividad fungistática, y en saliva tiene actividad fungicida (en líquido cefalorraquídeo no existe).
- d) Opcioninas de suero: pseudobeta globulina, factor C3 de complemento (C3 no se encuentra en la superficie de *Criptococos* colectado de líquido cefalorraquídeo), anticuerpos específicos IgG, que aumentan el contacto entre levadura y células fagocíticas o citotóxicas y permiten la fagocitosis. La inmunidad celular deficiente, aumenta la susceptibilidad a la criptococosis.
- e) Temperatura: *Є. neoformans* es la única especie del género capaz de desarrollarse in vitro a 39°C, lo que permite infectar al ser humano y animales, hace resistentes a los conejos con temperatura corporal de 39.6°C e inmunes a las palomas cuya temperatura es de 44°C.<sup>(1)</sup>

Los factores de virulencia que presenta el *Є. neoformans* son los siguientes:

- a) Producción de ureasa: se ha sugerido que la ureasa induce la liberación de amonio que inhibe la función del complemento del huésped. *Є. neoformans* no utiliza proteínas de suero, pero tiene enzimas como proteasas que degradan fibrinógeno humano in vitro, lo que podría explicar la ausencia característica de fibrosis

alrededor de las lesiones.

- b) Endotoxina: la inoculación intravenosa de  $10^8$  células de *É. neoformans* en conejos, induce una respuesta fébril semejante a la producida por endotoxina de bacterias gramnegativas.
- c) Cápsula: su composición química es glucoroxilomanana alfa unida a manosa y con menos de 0.2% de proteína. La cápsula de *É. neoformans* inhibe la fagocitosis y la unión macrófago-levadura; induce producción de linfocitos T supresores; se une al factor supresor de T1; induce tolerancia, parálisis inmunitaria, activa complemento por vía alterna, descomplementa el suero, absorbe o neutraliza opsoninas y anticuerpos protectores, inhibe la migración de leucocitos y suprime la producción de anticuerpos. .
- La cápsula es quizá el indicador de virulencia más importante, ya que cepas mutantes sin cápsula no son virulentas.
- d) Producción de melanina: en medios con un compuesto de fenol, *É. neoformans* produce feniloxidasas que transforman el fenol en compuestos tipo melanina. Las cepas melanina negativas son menos virulentas.

Producción de melanina junto con presencia de cápsula y capacidad de crecer a  $37^{\circ}\text{C}$  son los indicadores de virulencia más importantes.<sup>(1)</sup>

## ASPECTOS CLINICOS

Salvo raras excepciones, la puerta de entrada del criptococo son los pulmones. La infección pulmonar primaria puede permanecer localizada o estar diseminada en otros órganos. Algunas veces se presenta la afección en otros tejidos y sistemas orgánicos, a pesar de la curación de las lesiones pulmonares. Por esta razón a menudo, es difícil establecer el sitio de la infección inicial. Aunque la enfermedad experimental se ha producido alimentando con gran número de células de levadura a los animales, es dudoso que se presente la infección en el hombre por vía del conducto alimentario. Es posible, que el microorganismo entre a través de la piel y de la mucosa nasofaríngea, aunque también se considera extraordinariamente raro. Los tipos clínicos de la enfermedad criptococócica incluyen:

### Criptococosis

- Pulmonar (25%)
- Del SNC (45%)
- Cutánea o mucocutánea (10%)
- Diseminada o visceral (15%)
- Osea (5%) <sup>(2)</sup>

### CRIPTOCOCOSIS PULMONAR

La criptococosis pulmonar es una identidad clínica que por lo regular (95%) cursa de manera asintomática o subclínica y sólo se puede detectar mediante los rayos X y la correlación con la serología, utilizando la inmunofluorescencia indirecta (IFA). Los pocos casos asintomáticos se manifiestan desde estadios leves a graves, dependiendo del estado inmune del huésped. La enfermedad casi siempre se localiza de manera bilateral confinada al lóbulo superior, sin embargo hay casos unilaterales. La sintomatología de

la criptococosis leve, simula un cuadro gripal acompañado de tos, temperatura y discreto dolor pleural; sin embargo cuando el proceso se intensifica, la fiebre es más constante, hay pérdida de peso, astenia, adinamia y el paciente presenta tos con esputo mucoso o hemoptóico.<sup>(2,18)</sup>

A la exploración física se detecta alteración en el murmullo vesicular y estertores inconstantes. Es importante mencionar que cuando la enfermedad genera focos regulares, simula una neumonía por bacterias gramnegativas y en los casos graves se confunde con la tuberculosis miliar. Pocas veces se observa la formación de criptococomas.<sup>(2,3)</sup>

Los rayos X muestran una variedad de imágenes, por ejemplo infiltración que semeja tuberculosis, lesiones sólidas que simulan neoplasias o abscesos pulmonares, y cuando el proceso es crónico se puede observar un moteado miliar difuso.

La criptococosis a diferencia de la tuberculosis y otras enfermedades micóticas no forma linfadenopatías hiliares (referente al sistema ganglionar) y generalmente no afecta el mediastino. Simha y Naik reportaron un caso de criptococoma, que se presentó como una masa mediastinal, que progresó hasta infiltrar las vías aéreas y grandes vasos con pronóstico fatal.<sup>(2,3)</sup>

#### **CRIPTOCOCOSIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (S N C)**

Es la variedad más frecuente, o sea la que más se diagnostica, se origina a partir del foco pulmonar, posterior a una diseminación hematógena. La neurofilia de *C. neoformans*, se le ha atribuido a varias razones como son: la falta del factor anticriptococósico en LCR, así como la presencia de sustancias que estimulan su crecimiento como la asparragina y la creatinina.

La criptococosis en el SNC se puede presentar de tres formas o variedades:



- Meningitis (97%)
- Meningoencefalitis (2%)
- Criptococomas (1%) <sup>(2)</sup>

### **Meningitis**

Es la variedad más frecuente y por lo regular se manifiesta en forma crónica y gradual; se inicia con cefalea intensa (frontal), así como dolor de las órbitas oculares, hay fiebre constante pero no intensa (38°C). Los signos de meningitis crónica que se presentan son: rigidez, dolor de la nuca y son positivos los signos de Kerning y Brundzinski. Conforme el padecimiento se hace crónico, el enfermo presenta vómito constante, vértigo, delirio, alucinación, irritabilidad, convulsiones jaksonianas y pérdida temporal de la memoria. En algunos casos hay manifestaciones oftálmicas en forma de neurorretinitis y por la misma afección neuronal se presenta fotofobia, estrabismo diplopía y nistagmo.<sup>(2,3)</sup>

La meningitis criptococócica, toma un rumbo crónico dependiendo de las condiciones del paciente, hay reportes de cronicidad hasta de 20 años. Cuando el padecimiento progresa rápidamente, el ataque al estado general es severo, manifestándose con gran pérdida de peso, astenia y adinamia, dando paso al coma y por lo regular el paciente muere por insuficiencia respiratoria.<sup>(2)</sup>

### **Meningoencefalitis**

Es una entidad clínica rara, casi siempre de curso agudo y fulminante; lo presentan pacientes con severa inmunodepresión, como sidosos o pacientes sometidos a intensa corticoterapia (transplantes). El enfermo presenta todos los signos y síntomas de una meningoencefalitis aguda, y rápidamente cae en coma, que en término de 2 a 3 días lo lleva a la muerte.<sup>(2,3)</sup>

### **Criptocomas (Granulomas Criptococales)**

Son una entidad extraordinariamente rara, se conforman de masas fúngicas que se desarrollan en el cerebro, en forma de abscesos que regularmente se confunden con neoplasias. Los pacientes en un inicio presentan cefaleas, náuseas, vómitos, convulsiones de tipo jacksonianas, y por la misma compresión cerebral medular, se generan diversas manifestaciones oftálmicas, hemiplejía y hemiparesias. El curso de esta variedad también es grave y migra fácilmente al coma, paro respiratorio y muerte.<sup>(2,3)</sup>

### **CRIPTOCOCOSIS CUTANEA**

#### **Cutánea Primaria**

Es una entidad clínica rara, se inicia a partir de la inoculación del hongo por vía cutánea, a través de una solución de continuidad, formándose un complejo primario, similar al de la esporotricosis, constituido por linfangitis y adenitis, dependiendo de las condiciones del paciente (estado inmune). La lesión primaria puede involucionar por completo o manifestarse en forma de lesiones nódulo-granulomatosas. La topografía clínica depende del sitio de inoculación y por lo regular es en miembros superiores e inferiores. Cuando el proceso esta bien establecido, la morfología cutánea es de abscesos ulcerados, o bien lesiones papuloides de tipo acneiforme.<sup>(2,3,19)</sup>

#### **Cutánea Secundaria**

Es una entidad clínica más común, se origina a partir de la diseminación hematógica o linfática de criptococosis pulmonar y/o meníngea. La topografía preferente es en cara, cuello y miembros. Los aspectos morfológicos son similares a los de la criptococosis primaria, es decir dan lesiones pápuloacneiformes, abscesos, úlceras y en raras ocasiones lesiones verrucosas, por lo regular los pacientes refieren escaso prurito y poco dolor. A diferencia

de la criptococosis primaria, ésta variedad tiene mal pronóstico.<sup>(2,3)</sup>

#### **CRIPTOCOCOSIS OSEA**

Es una entidad clínica relativamente frecuente, se calcula que aproximadamente el 10% de los casos de criptococosis tiene manifestación oséa. Se origina a partir de focos pulmonares y/o meníngeos, tiene una predilección en orden decreciente por huesos largos (fémur, tibia, esternón, etc.), huesos craneales y vértebras; puede afectar las articulaciones. Las lesiones más comunes son de periostitis, osteofibrosis y sobre todo francas zonas de osteólisis, en este último tipo de lesiones se pueden originar fístulas que salen a piel y drenan un material seropurulento mucoide. La sintomatología más frecuente es de intenso dolor óseo y artralgias.<sup>(2,3)</sup>

#### **CRIPTOCOCOSIS DISEMINADA (Visceral)**

En la enfermedad diseminada cualquier órgano o tejido del cuerpo puede tener focos de infección. Se producen lesiones granulomatosas y gelatinosas que se asemejan sintomáticas y aún histológicamente a las neoplasias malignas, sobre todo a las del tipo mixomatoso. Corazón, testículos, próstata y ojos son afectados en forma frecuente, mientras que riñón, suprarrenales, hígado, bazo y ganglios linfáticos en general, están exentos. Las lesiones en vías gastrointestinal y genitourinario, imitan tuberculosis, pero se encuentran con mucha menor frecuencia en la criptococosis. Pueden ser del tipo gelatinoso o granulomatoso, pero rara vez son del tamaño suficiente para manifestar síntomas antes de la muerte.<sup>(3)</sup>

En los informes publicados de extensas series de necropsias, se encuentran registradas muy pocas lesiones criptococócicas en

testículos, timo y tiroides, pero no en glándula hipófisis. Tampoco se ha registrado presencia de lesiones criptocócicas en músculo esquelético (músculo estriado), laringe, tráquea, esófago y estómago.<sup>(3)</sup>

Las lesiones en mama, sólo se han presentado dos veces en seres humanos y hasta ahora no existe ninguna publicación sobre lesiones invasivas en genitales femeninos. En la etapa tardía de la enfermedad, las levaduras son diseminadas por vía hematógena (criptococaemia) y los microorganismos se observan en las asas glomerulares de los riñones, así como en los capilares de muchos sistemas orgánicos. En esta etapa tardía de la enfermedad, en pacientes con inmunosupresión, el desarrollo masivo de levaduras y la producción de material capsular produce tanta presión como para romper los dedos de las manos abiertas, los músculos del muslo y otras partes.<sup>(3)</sup>

Muy rara vez se han encontrado infecciones nosocomiales. Sin embargo la sépticemia nosocomial ocasionada por *C. neoformans* seguida del establecimiento de infección y muerte, está bien comprobada.<sup>(3)</sup>

## DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La identificación de *C. neoformans* en montajes húmedos, frotis de material infectado y el cultivo de muestras son bases del diagnóstico de la infección criptocócica.<sup>(1)</sup>

Si las muestras consisten en líquidos corporales, pueden sedimentarse por centrifugación a 5000 r.p.m. o más antes del examen microscópico y cultivo evitando toda contaminación durante el proceso. Una pequeña porción del líquido sedimentado se podría conservar para detención de antígenos.<sup>(1,11)</sup>

Si se entrega tejido pulmonar o cerebral, inclusive para el esputo o pus, se deberá hacer un tratamiento con hidróxido de potasio al 15% incubándose a 37°C durante 30 minutos, antes de examinarlo en montaje con tinta china o sin ella, por que el KOH digiere células y otros artefactos que podrían confundirse con *Cryptococcus*.<sup>(1,3)</sup>

Los exámenes histológicos de tejido, deben incluir coloraciones especiales, aparte de las tinciones acostumbradas.<sup>(1)</sup>

### EXAMEN DIRECTO Y TINCIIONES

Las levaduras de *C. neoformans*, son muy frágiles y se colapsan o se convierten en formas de media luna en frotis secados, fijados o coloreados. A pesar de que se identifican sin dificultad en preparaciones teñidas con colorantes histopatológicos, se debe llevar a cabo el examen directo en montajes húmedos. La cápsula es tan característica que en material infectado, mezclado con una gota de tinta china, nigrosina o cualquier medio de montaje coloidal coloreado, los microorganismos encapsulados son delineados por contraste negativo.<sup>(3,15)</sup>

Esta levadura se identifica de manera más fácil en frotis coloreados con tinción de Gram de líquido espinal, secreciones

respiratorias, u otro material infectado. Además de su cápsula, *Criptococos* difiere de otros microorganismos como de *Blastomyces*, *dermatitidis*, dado que su pared es más delgada y las yemas estan unidas a la célula madre por un angosto istmo, Del género *Candida*, se diferencia por que es redondo en lugar de ovalado y no forma pseudohifas ni hifas.<sup>(1,3,13,14)</sup>

Aunque existe el peligro de confundirlos con linfocitos, células tisulares, minúsculas gotas de grasa , glóbulos de mielina o partículas agregadas a tinta china, si se observan al microscópio con luz tenue, se pueden ver las células en gemación dentro de la cápsula y por lo tanto los microorganismos se pueden diferenciar de una manera más precisa.<sup>(1,3)</sup>

#### CULTIVO

Las cepas patógenas de *C. neoformans*, son poco exigentes y crecen bien a 37°C, sin embargo muestran sensibilidad variable a la cicloheximida (Actidione),\* la cuál es incorporada a la mayor parte de los medios selectivos para hongos patógenos, este antibiótico fue usado durante algún tiempo en el tratamiento de la meningitis criptococócica. El material proveniente del paciente se siembra por estría en medio SGA (Agar Sabourad Glucosa) o SGA con antibióticos antibacterianos. Algunos informes sobre las formas lábiles de las levaduras, indican que hay más procedimientos que pueden ser valiosos, sobre todo si los cultivos iniciales son negativos o si, el paciente está recibiendo tratamiento con Anfotericina B.\*<sup>(1,3,19)</sup>

El crecimiento con el material del paciente en medios de aislamiento primario, se presenta en 24 a 48 horas, no obstante los cultivos se deben conservar durante cuatro a seis semanas. Después del aislamiento inicial, las colonias son sembradas por estría en agar-infusión de corazón, de modo que se pueden tomar clonas solitarias para utilizarlas en estudios fisiológicos con el

\* ver apéndice

fin de confirmar la identificación.<sup>(3)</sup>

El aislamiento de *Cryptococcus* de material muy contaminado como nidos y excremento de palomas, se puede llevar a cabo con otro medio selectivo usando semillas de *Gulzotia abyssinica* añadido de creatinina, asparragina y cloranfenicol, ya que los dos primeros compuestos son sólo asimilados por *C. neoformans*, mientras que el cloranfenicol es un inhibidor de bacterias, además sólo las colonias de *C. neoformans* desarrollan un color parduzco o marrón en este medio.<sup>(1,3)</sup>

Algunos microorganismos aislados tendran cápsulas muy pequeñas en su primer aislamiento. La producción de cápsula, es estimulada por el desarrollo de microorganismos en agar-chocolate a 37°C en incubadora con dióxido de carbono CO<sub>2</sub>.<sup>(3)</sup>

La identificación específica de *C. neoformans*, requiere del estudio de una combinación de factores que incluyen características fisiológicas como: producción de ureasa, tolerancia a la temperatura (37°C), falta de micelio en agar harina de maíz y reducción de nitratos, además de perfiles de asimilación de carbono y patogenicidad animal.<sup>(1,3,19)</sup>

Algunos textos, reportan como pruebas más confiables para la identificación de *C. neoformans*, el desarrollo en cultivo a 37°C y patogenicidad para ratones<sup>(1,3)</sup> aunque al parecer, algunas cepas identificables de *C. neoformans* no son patógenas.<sup>(3)</sup>

## SEROLOGIA

Los intentos para establecer el diagnóstico de criptococosis sobre la base de títulos elevados de anticuerpos, han sido frustrados por la falta de pruebas confiables, lo cual refleja al parecer, la mala antigenicidad de *C. neoformans* y el hecho de que muchos enfermos infectados tienen trastornos inmunológicos subyacentes, que podrían comprometer la síntesis de

anticuerpos.<sup>(1,3,4)</sup>

La única prueba serológica útil para identificar pacientes con infección criptocócica, es la aglutinación de partículas látex revestidas con anticuerpos formados contra la cápsula criptocócica (LCAT). Esta prueba mide antígeno capsular criptocócico en suero o líquido cefalorraquídeo de pacientes infectados, el polisacárido capsular reacciona con el anticuerpo sobre la partícula de látex y aglutina. Aunque las pruebas falsas positivas son raras, *C. neoformans* es en general fácil de cultivar y el diagnóstico de infección criptocócica debe hacerse siempre por cultivo.<sup>(1)</sup>

Las pruebas de detección de anticuerpo criptocócico no son útiles en el diagnóstico, por que algunas personas normales tienen anticuerpos y la mayoría de pacientes carecen de ellos, podemos encontrar pruebas reproducibles y exactas que utilizan técnicas de inmunofluorescencia (IFA), para descubrir anticuerpos de criptococos. También existen otras como la prueba de fijación de complemento (FCAg) y prueba de aglutininas en tubo (TA). Pero por desgracia, ninguna de las pruebas anteriores por sí solas e inclusive en combinación (IFA, LCAT, FCAg y TA), pueden todavía dar resultados confiables en un 100%.<sup>(1,3,11)</sup>



## TRATAMIENTO

Las lesiones locales de los pulmones tienen buen pronóstico en pacientes normales, curan lentamente sin tratamiento y desaparecen o dejan cicatriz residual. En general las lesiones primarias, cutáneas o mucocutáneas se resuelven en forma espontánea. En infecciones generalizadas el desenlace suele ser mortal, a menos que el paciente reciba tratamiento. En la actualidad, se disponen de varios fármacos con eficacia clínica comprobada.<sup>(3)</sup>

Antes de la introducción de la Anfotericina B \* en 1957, la meningitis criptocócica era casi siempre mortal, la administración de este fármaco ha producido un índice aproximado de curaciones del 60%. Si se tratan en forma diaria, los adultos reciben 0.5 mg por kg de peso corporal, aunque se han usado dosis de 0.3 a 1.0 mg por kg. La duración del tratamiento se ha guiado por la rapidez con la que se normalizan los hallazgos de líquido cefalorraquídeo, incluyendo la determinación de antígeno y por el estado clínico; en general se tratan de 6 a 10 semanas. De manera ocasional la prueba de tinta china puede seguir siendo positiva durante meses o años, aunque los cultivos sean negativos. Este hallazgo, no indica que deba continuarse el tratamiento más allá de las dosis recomendadas.<sup>(1)</sup>

La 5-fluorocitosina (5-FC),\* es un agente antifúngico oral con buenos efectos in vitro contra *C. neoformans*, penetra fácilmente en el líquido cefalorraquídeo y las reacciones tóxicas son poco comunes, es lamentable que en las dosis administradas (150 mg / kg por día), su efecto terapéutico parezca inferior al obtenido con Anfotericina B, además por lo general se produce resistencia al fármaco durante el tratamiento con 5-FC, lo que no ocurre con Anfotericina B. Por estas razones 5-FC sola no se recomienda.<sup>(1)</sup>

\* ver apéndice

La terapéutica combinada de Anfotericina B y 5-FC ha demostrado sinergia in vitro e in vivo contra *C. neoformans*. Estudios preliminares en humanos también son promisorios y este esquema podría ser el mejor tratamiento para meningitis criptocócica, las dosis habituales son de 150 mg de 5-FC diarios por vía bucal y 20 mg de Anfotericina B intravenosos por día. El tratamiento combinado se aplica durante 6 semanas. No obstante se han presentado fracasos con este régimen, pero se han tenido buenos resultados si después se administra Miconazol.<sup>\*(1,3)</sup>

Aunque no se conocen medidas profilácticas contra la infección por *C. neoformans*, se recomienda la Anfotericina B como medida profiláctica después de la extirpación quirúrgica de lesiones criptocócicas<sup>(1,3)</sup>

En la actualidad el fluconazol aunque de un costo muy elevado, ha demostrado ser el fármaco más adecuado en la criptocósis meníngea así como en otras micosis que afectan SNC. Otro medicamento, el Itraconazol, ha sido comparado con otros tratamientos convencionales y los resultados han sido bastante favorables, ya que presenta una baja toxicidad y una buena eficacia en el tratamiento de meningitis criptocócica.<sup>(2,3,10)</sup>

También se ha observado que el ajo es activo contra *Criptococos* así como contra hongos, se ha usado un extracto para administración por vía bucal e intramuscular en pacientes con meningitis criptocócica, pero aún no se determinan los resultados obtenidos usando este compuesto.<sup>(2,3)</sup>

Un punto importante en el tratamiento y que no se debe perder de vista es el factor predisponente, el cuál debe ser corregido, para que cualquiera de los tratamientos aplicados sea realmente eficaz.<sup>(1,2,3)</sup>

\* ver apéndice

## METODOLOGIA

### RECOLECCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

En base al conocimiento del hábitat, características fisiológicas y tomando en cuenta aislamientos de *E. neoformans* en otros lugares, así como experiencias propias acerca de este microorganismo realizamos nuestro muestreo de la manera que juzgamos más conveniente.

Las muestras fueron tomadas con hisopos e introducidas en tubos de ensaye conteniendo 1ml de solución salina (grado fisiológico 0.85%), añadida de cloranfenicol, para eliminar posible contaminación bacteriana; una vez recolectadas las muestras, los tubos fueron tapados y transportados al laboratorio para su procesamiento.

Con el fin de lograr un correcto aislamiento de Criptococos y poder obtener resultados más precisos, se tomaron varios parámetros para un buen muestreo como:

- Colectar las excretas lo más frescas posible, desechando aquellas que estuvieran secas.
- Tomarlas de lugares que no tuvieran un contacto directo con el suelo.
- Buscar sitios que no estuvieran expuestos directamente a la luz solar.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, fueron colectadas y transportadas al laboratorio 160 muestras de excretas de paloma. Una vez en el laboratorio y en área estéril, resuspendimos las muestras en 9 ml de solución salina, quedando estas a una dilución de 1:10, suspensión que usamos para posteriormente sembrarlas por estría en medio agar-niger contenido en cajas de petri, e incubándolas a temperatura ambiente

durante 48 horas o más según el desarrollo de las colonias.

Con objeto de favorecer el crecimiento de la levadura (*Eryptococcus*) modificamos el medio, añadiéndole cloranfenicol con el fin de inhibir bacterias, además lo enriquecimos con creatinina y asparragina para favorecer su crecimiento, ya que estos compuestos son agentes nutricionales específicos para *Eryptococcus neoformans*<sup>(2)</sup>

La relación de los sitios donde fueron colectadas las 160 muestras son los siguientes:

NUMERO DE MUESTRAS	SITIO DE MUESTREO
20	Plaza de San Miguelito
10	Plaza de San Francisco
10	Plaza de Armas
10	Plaza de Tequisquiapan
10	Plaza del Carmen
30	Estación de Ferrocarriles
20	Palomar 1
10	Palomar 2
10	Palomar 3
10	Palomar 4
10	Palomar 5
10	Palomar 6

## EXAMEN DIRECTO

Después de incubar los cultivos, seleccionamos las colonias tomando en cuenta características macroscópicas y microscópicas.

A simple vista las características deberían de ser, colonias de forma convexa, de aspecto mucóide, brillante y de color blanco, parduzco, amarillento, ligeramente rosado o hasta color marrón, este pigmento es indicativo de *C. neoformans*.

Para poder observarlas al microscopio utilizamos una preparación en fresco observando directamente, con tinta china o nigrosina, que nos pudiera dar el contraste deseado para observar y diferenciar las levaduras de *Cryptococcus*, que son esféricas con cápsula y en algunos casos muy notoria, aunque en la mayoría de las veces la presenta muy escasa, pero representativa del género.

Ya seleccionadas las colonias, las resembramos en tubo con medio de niger, para después poder realizarles pruebas fisiológicas y bioquímicas específicas.

## PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Para hacer una plena identificación de las colonias recuperadas en el guano de las palomas se practicaron las siguientes pruebas a cada una de ellas.

### -Producción de Pigmento en Medio de Niger

El medio selectivo para *C. neoformans*, es a base de semilla de negro (*Gulzotia abyssinica*), donde genera colonias café marrón al transformar el ácido caféico (principio activo de la semilla), en un compuesto polimérico semejante a la melanina, distinguiéndose así de otros géneros y especies.<sup>(2)</sup>

Todas las colonias recuperadas a partir del primocultivo se sembraron en tubo conteniendo medio de niger con objeto de identificar todas aquellas que producían color café o marrón y

\* ver apéndice

separalas para llevar a cabo las pruebas que a continuación se describen. Aunque hacemos la observación de que algunas cepas dieron un pigmento melánico desde el primocultivo, otros lo dieron sólo después de un período prolongado de incubación.

#### -Prueba de Ureasa

Mediante esta prueba es posible diferenciar el género *Candida* del género *Cryptococcus*, siendo positiva sólo para este último.

Se llevó a cabo en el medio de agar urea de Christensen\* inoculando por estria en la superficie del agar. dentro de la composición de este medio se incluye un indicador, el rojo de fenol que vira al rojo cuando es hidrolizada la urea por acción de la ureasa produciéndose amoniaco.

Se incluyeron como controles positivos dos cepas de *C. neoformans* donadas por el "Hospital General" de la ciudad de México, como control negativo se usó una cepa de *Candida albicans* del laboratorio de Micología.

#### -Termorresistencia a 37°C

Al mismo tiempo que se realizó la prueba de producción de ureasa, se valoró la capacidad de desarrollo a 37°C de cada colonia y de las cepas testigo de *C. neoformans*.

Está reportado en la literatura, que a una temperatura de 37°C *C. neoformans*, presenta crecimiento similar al obtenido a temperatura ambiente, aunque las variedades saprófitas de *C. albidus* var *albidus*, *C. albidus* var *diffluens*, *C. terreus* y *C. laurentii*, también son capaces de desarrollar a la misma temperatura, diferenciándose las tres primeras de *C. neoformans* por su capacidad de asimilar nitratos.

Para llevar a cabo esta prueba, se subcultivaron las colonias en agar medio de niger y se incubaron a 37°C por 72 horas, al término de este tiempo se comparó el crecimiento de las cepas problema con las testigo y se evaluó por cruces.

\* ver apéndice

**-Auxonograma**

Una de las características de las levaduras es la de asimilar azúcares, los cuáles representan una fuente de carbono para las mismas, cada levadura asimila tipos diferentes de azúcares, variando unas de otras. En base a lo anterior y conociendo que tipo de carbohidratos asimilan cada género e inclusive cada especie de levaduras, podemos diferenciarlas usando medios que contengan diferentes azúcares individualmente.

Para este fin usamos los equipos API 20C<sup>(20)</sup> para la identificación de levaduras, los cuáles contienen 19 azúcares en forma separada, que nos indican cuáles son asimilados por nuestra levadura problema, usando un patrón de turbidez (Wickerham) en comparación con un testigo negativo presente en el equipo y tras una incubación de 72 horas a 30°C, checando cada 24 horas, que azúcares son asimilados.<sup>(20)</sup>

Los azúcares que contiene el equipo API 20C son los siguientes:

GLU	glucosa	GLY	glicerol	2 KG	2-keto-D-gluconato
ARA	L-arabinosa	XYL	xilosa	ADO	adonitol (ribitol)
XLT	xilitol	GAL	galactosa	INO	inositol
CEL	celobiosa	LAC	lactosa	SOR	sorbitol (glucitol)
MAL	maltosa	SAC	sacarosa	MDG	metil-D-glucosido
TRE	trehalosa	M	memelesit	RAF	rafinosa
NAG	N-ac-D-glucosamina				

El principio fisicoquímico de los sistema API 20C, se fundamenta en la asimilación de los carbohidratos, la cuál determina la habilidad de un organismo para utilizar un carbohidrato como la única fuente de carbono. Lo cuál es necesario para el cultivo y crecimiento del microorganismo.

## RESULTADOS

Partiendo del total de muestras colectadas, de los diferentes sitios ya citados, nuestros resultados son los siguientes.

De los 160 cultivos correspondientes a cada una de las muestras, 25 fueron descartados por excesiva contaminación, quedando 135 cultivos o muestras como nuestro 100%, (Gráfica 1).

A partir de estos, seleccionamos aquellos que presentaran colonias sospechosas mediante una tinción directa con tinta china, según sus características morfológicas como son, forma y tamaño de la levadura y tamaño de la cápsula, las cuáles determinamos en comparación con un testigo ya identificado plenamente como *E. neoformans*, donado por el "Hospital General" de la ciudad de México. En base a lo anterior, resembramos dichas colonias en tubo conteniendo medio de agar niger, obteniendo 81 resiembras representativas de 81 primocultivos y descartamos 54 primocultivos, donde no encontramos cepas probables de ser *Criptococos*, (Gráfica 2).

Una vez seleccionadas y resembradas las 81 colonias, efectuamos la prueba de Producción de ureasa para cada una de ellas, obteniendo 68 colonias positivas a esta prueba y 13 que resultaron negativas a la misma, (Gráfica 3).

Otra prueba que realizamos, fue la de termorresistencia a 37°C, para esto tomamos 3 criterios en esta prueba para clasificar los resultados, donde 45 colonias tuvieron un buen crecimiento, 12 colonias desarrollaron de una manera pobre y en 11 colonias no hubo crecimiento a 37°C, (Gráfica 4).

Las pruebas anteriores (producción de ureasa y Termorresistencia a 37°C), nos sirvieron como parámetro de diferenciación del género (sobre todo la prueba de producción de ureasa), ya que nos determinaron cuantas y que colonias, resultaron ser del género *Cryptococcus*, para después practicarles



a estas, los exámenes para determinar la especie, los cuáles enunciaremos más adelante.

Con el fin de reconocer la especie del género *Eryptococcus*, existen varias pruebas como son: Reducción de nitratos, Producción de pigmento en medio de niger, e inclusive pruebas complementarias como desarrollo de micelio en agar harina de maíz y virulencia en ratón. Pero una prueba determinante es el Auxonograma, por lo que con esta prueba y algunas de las anteriores, pudimos identificar la especie de nuestras levaduras.

Las pruebas de termorresistencia y Pigmentación en medio de niger, presentaron resultados variables. En cuanto a la termorresistencia, el crecimiento no fué posible determinarlo con precisión. (Ver Graf. 4) y en cuanto a la producción de pigmento, así como hubo colonias que presentaron dicho pigmento a las 48 horas, hubo otras que lo presentaron tras una incubación más prolongada.

Por lo tanto y en consideración a lo anterior, decidimos practicar el Auxonograma a las 68 cepas productoras de ureasa, obteniendo así una identificación confiable de cada una de las colonias en estudio.

La proporción de cada género y especie identificado por el Auxonograma, es la siguiente:

	Número de Cepas (Tot 68)
C. albidus var. diffluens	46
C. albidus var. albidus	17
C. neoformans	2
Trichosporon beigelli	2
C. laurentii	1 (Ver Graf. 5)

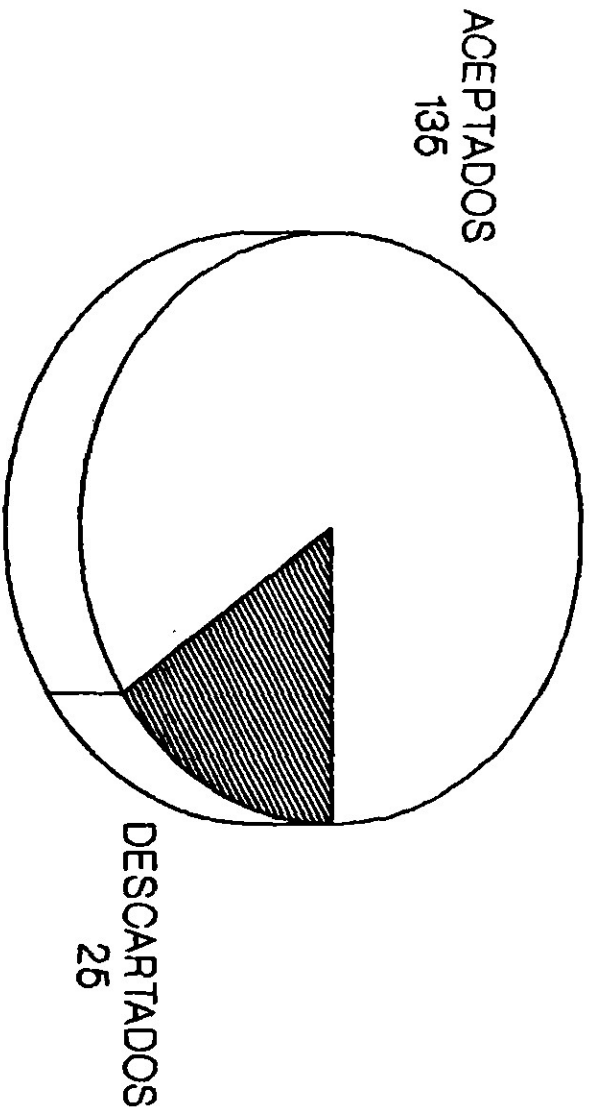
Una de las dos cepas aisladas de *C. neoformans*, fue recuperada de un palomar particular y la segunda de un sitio

público.

Por lo tanto y tomando en cuenta el número de muestras y sitios donde fueron colectadas, los porcentajes referentes al aislamiento de *É. neoformans*, para una población (1.1%, referente a sitios públicos), en comparación con la otra (1.4%, referente a palomares particulares), difieren muy poco.

= GRAFICA NUMERO 1 =

# PRIMOCULTIVO

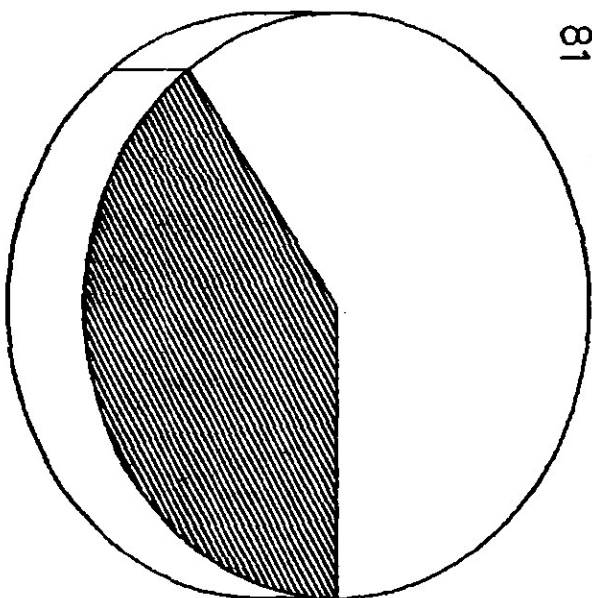


PARA POSTERIORES ESTUDIOS, LAS 136 MUESTRAS ACEPTADAS FUERON CONSIDERADAS COMO EL 100%.

- GRAFICA NUMERO 2 -

# SELECCION DE COLONIAS POR TINCION CON TINTA CHINA

CON RESEMBRA  
81

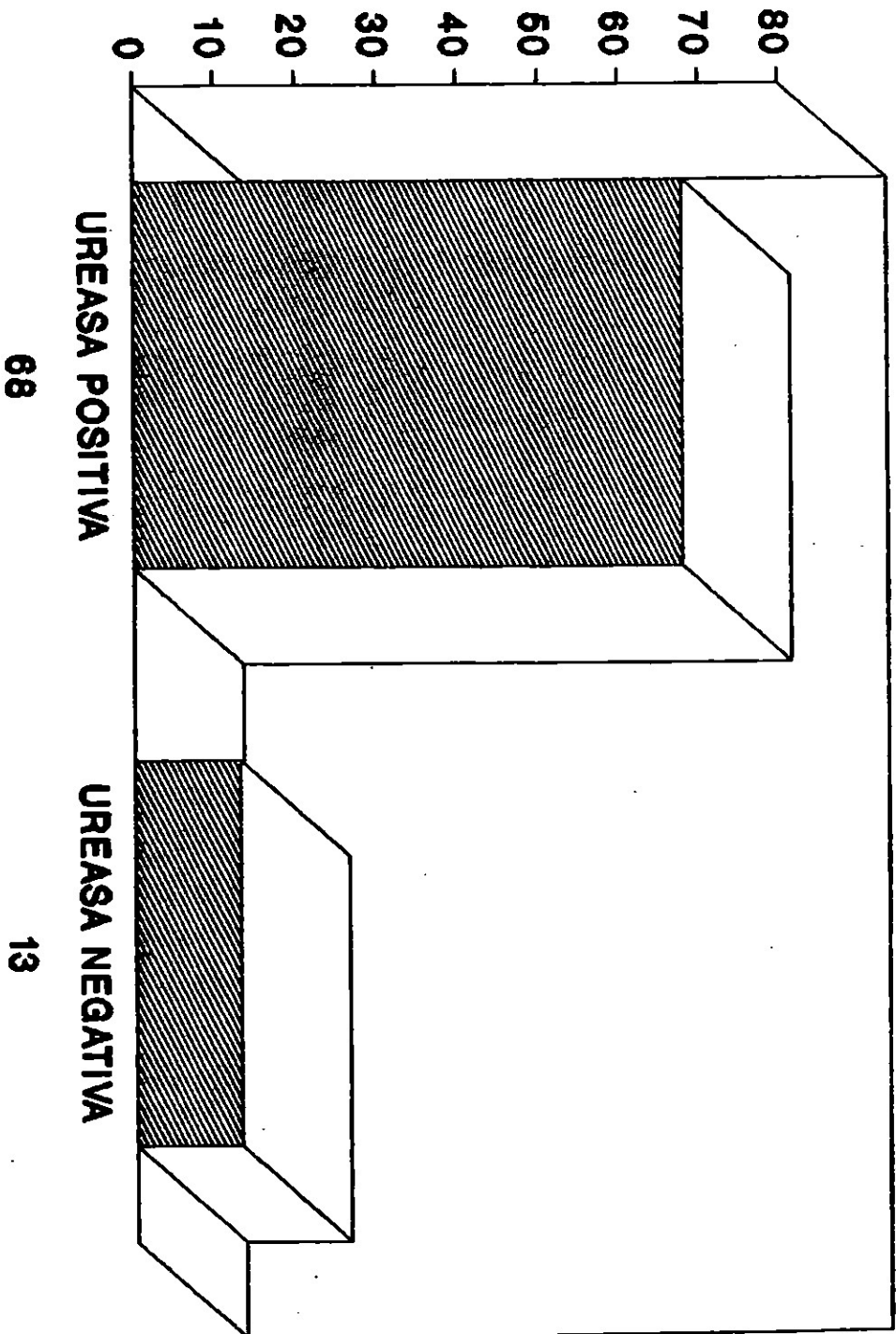


SIN RESEMBRA  
64

81 PRIMOCULTIVOS FUERON RESEMBRADOS  
Y 64 DESCARTADOS EN BASE A SUS  
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.

= GRAFICA NUMERO 3 =

# PRODUCCION DE UREASA

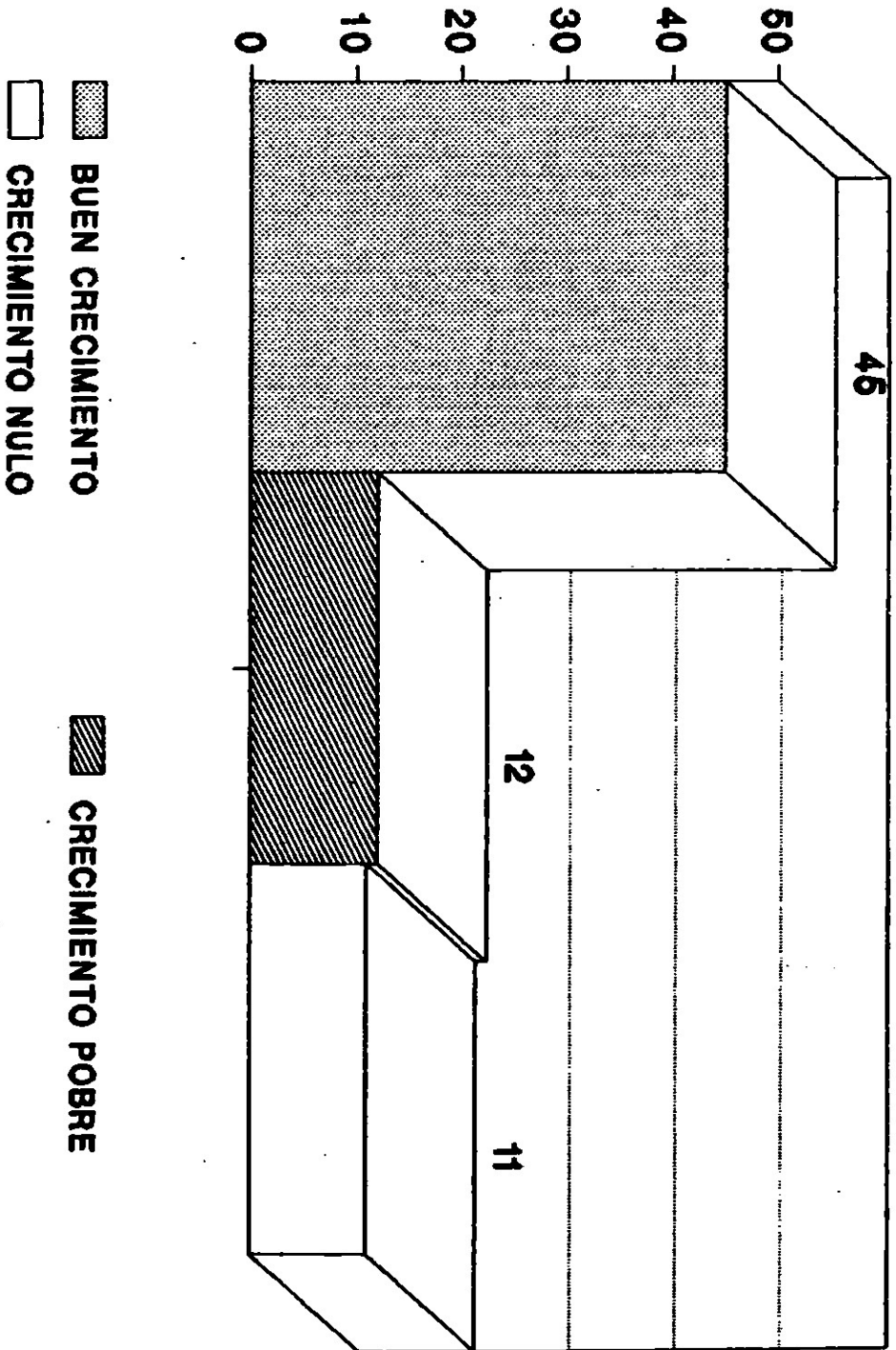


LAS CEPAS UREASA NEGATIVA SE DESCARTARON Y SOLO LAS CEPAS UREASA POSITIVA FUERON CONSIDERADAS PARA POSTERIORES ESTUDIOS.



= GRAFICA NUMERO 4 =

# TERMORRESISTENCIA A 37 ° C

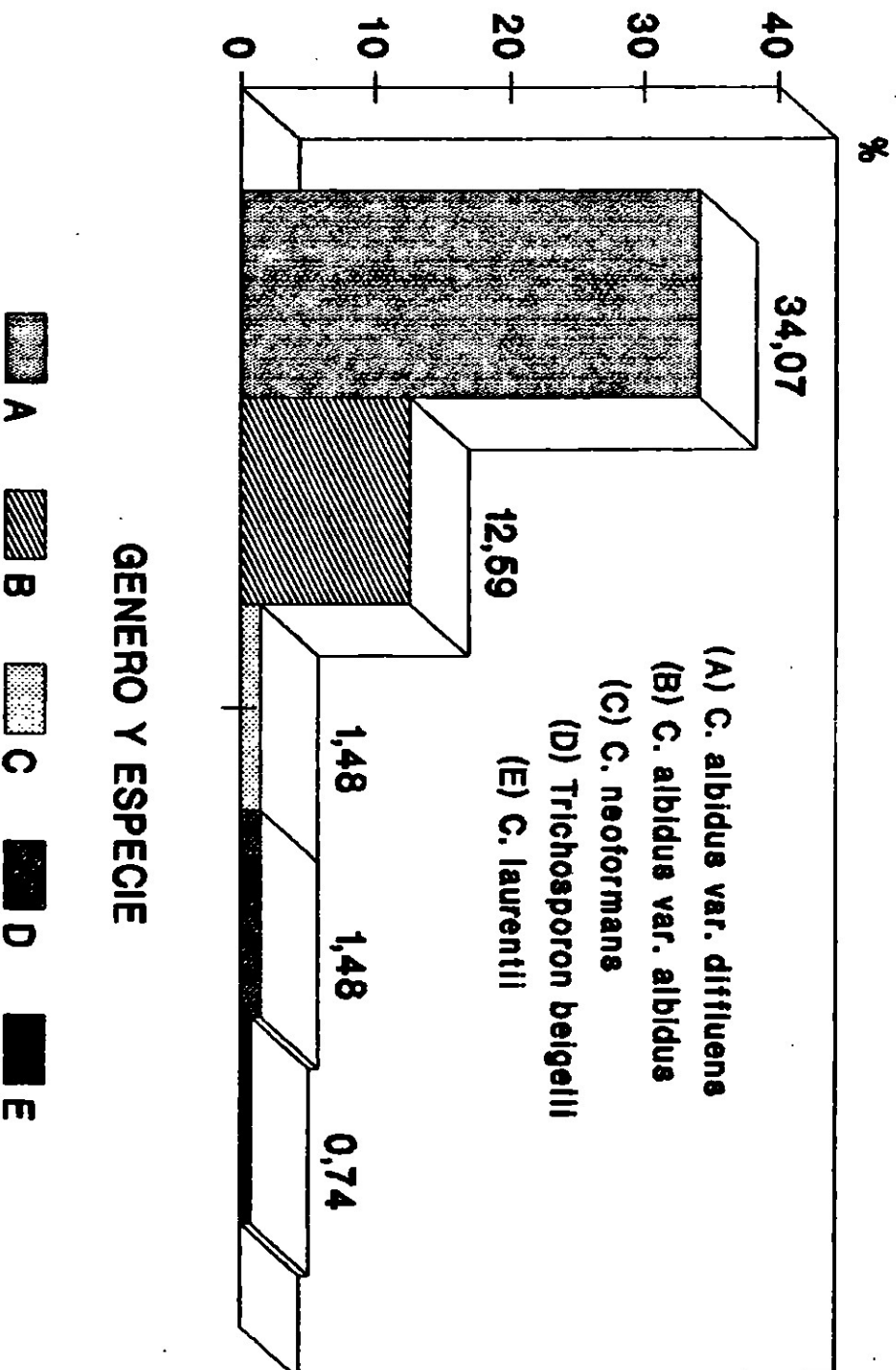


EL TIEMPO DE INCUBACION FUE DE 48 HORAS  
AUNQUE NO FUE PRECISO, USAMOS ESTAS TRES  
CLASIFICACIONES EN EL CREC. A 37 ° C

= GRAFICA NUMERO 5 =

# AUXONOGRAMA

## DIFERENCIACION ESPECIFICA DE CADA GENERO



LOS PORCENTAJES ESTAN EN RELACION AL  
NUMERO TOTAL DE MUESTRAS, QUE FUE DE 136

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la ciudad de San Luis Potosí, determinamos que *E. neoformans* está presente en las excretas de paloma, aunque en un porcentaje inferior al reportado en otros lugares de la República Mexicana.

Doce lugares, fueron los sitios de muestreo, los cuales los clasificamos en DOS poblaciones, con un factor común para cada una, SEIS correspondieron a sitios públicos y la otra mitad a palomares particulares.

Respecto a la identificación específica, del género *Eryptococcus*, las pruebas fisiológicas y bioquímicas que se realizaron indican que, sólo con la adecuada complementación de estas se puede alcanzar una precisa identificación, resaltando la importancia de practicar un auxonograma extenso con el sistema API 20C.

EL análisis de los resultados, indica una diferencia muy pequeña respecto al porcentaje de aislamientos de *E. neoformans* entre las dos poblaciones representadas por los sitios públicos y los palomares particulares.

## DISCUSION

Los porcentajes obtenidos en los aislamientos de *Є. neoformans* son muy inferiores a los reportados por otros autores como, Rubén López M. que reporta un 17.6 % de recuperación a partir de excretas de palomas en la ciudad de México y por Emmons, que reportó hasta un 69 % de aislamientos mediante el estudio en que demostró el hábitat natural de la levadura.

Los sitios en que encontramos *Є. neoformans* fueron DOS, un palomar particular y una oficina pública, ambos lugares presentaron en común características como hacinamiento, falta de higiene y total aislamiento de la radiación solar, factores que no están presentes en las plazas públicas donde habitan especies de vida libre y que parecen tener gran significación en la prevalencia de este agente.

Creemos, que es más grande el hecho de que exista una fuente de infección en un lugar de acceso público como es, el de las oficinas ya mencionadas, que en sitio particular, donde las condiciones de vida de las palomas pueden ser controladas. Tan importante es este hecho, que con objeto de hacer una aportación útil con el estudio, se solicitó al dueño del palomar contaminado, que modificara sus instalaciones permitiendo una mejor ventilación y una mayor exposición a los rayos solares, además del uso de una solución diluída de Hipoclorito de Sodio, para desinfectar el lugar; así como la administración de Ketoconazol a las palomas, para erradicar la levadura del tracto intestinal de las mismas.

Todo esto con la finalidad de eliminar la fuente de infección; haciendo constar que mantenemos pendiente un estudio posterior, para verificar si efectivamente se erradicó al *Є. neoformans*, con las indicaciones anteriores.

En el otro sitio (oficinas públicas), donde también se encontró *Є. neoformans* resultaría más complicado controlar los

factores ya mencionados, pero consideramos que una medida profiláctica urgente, aunque un drástica sería la remodelación de las oficinas, cuyo ático sirve de resguardo a las palomas, el cual está tan deteriorado que el guano de las aves se filtra por sus hendiduras, esparciéndose en el ambiente con gran riesgo, tanto para el personal que ahí labora, así como la población que tiene la necesidad de acudir al lugar.

Debemos mencionar que en este sitio, (oficinas públicas), decidimos comprobar la presencia de *E. neoformans*, suspendido en el aire, logrando recuperarlo por exposición durante 15 minutos en medios de cultivo (Niger), en cajas de petri.

Otros aspectos que deseamos analizar, corresponden a los métodos empleados para la identificación de *E. neoformans*, pues suponemos que los reportes de algunos autores pueden mostrar cifras superiores a las reales, si tomamos en consideración que cepas de *E. albidus* pueden ser confundidas con *E. neoformans*, si su identificación es en base a sus características morfológicas y fisiológicas como; termorresistencia y producción de pigmento únicamente.

Considerando que para lograr una identificación confiable debe practicarse un auxonograma y/o la inoculación en ratón, aunque de esta última podemos decir que existen reportes de cepas de *E. albidus* y *laurentii*, patógenos para el mismo,<sup>(2)</sup> así como también existen cepas de *E. neoformans* reportadas como no patógenas.<sup>(3)</sup>

Ponemos a discusión una prueba adicional que practicamos a cepas recuperadas y reconocidas de *E. neoformans* y *albidus*, en medio de agar chocolate, incubando a 37°C y en condiciones microaerofilicas,<sup>(3)</sup> con objeto de inducir un aumento en la síntesis *in vitro*, con muy buenos resultados para *E. neoformans*, ya que no hacemos mención de esta prueba anteriormente.

## APENDICE

### a). MEDIO DE AGAR SABOURAUD DEXTROSA (ASD)<sup>(2,19)</sup>

Dextrosa	40 gr
Peptona	10 gr
Agar-agar	15 gr
Agua destilada	1000 ml
pH final	5.6

Se hierve el medio hasta dilución completa, se distribuyen en tubos de 16x150 (aproximadamente 7 ml), con taponés de gasa y algodón; esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos a 15 libras de presión, posteriormente se sacan y se inclinan.

### b). AGAR MEDIO DE ALPISTE NEGRO (NIGER)<sup>(2,19)</sup>

Alpiste negro o niger (pulverizado)	70 gr
Cloramfenicol	50 mg
Creatinina	50 mg
Asparragina	50 mg
Agar bacteriológico	20 gr
Agua destilada	1000 ml

Una vez pulverizadas las semillas de alpiste negro (*Guizotia abyssinica*), dejar remojar el alpiste negro en 1 lt de agua, hervir durante 30 minutos, posteriormente filtrar en gasa y papel filtro. Adicionar 20 gr de agar y aforar a 1 lt; autoclavar a 110°C por 15 minutos. Enfriar a 50°C, adicionar el cloramfenicol, la asparragina y la creatinina, homogenizar y servir en placa o tubos.



c). AGAR UREA DE CHRISTENSEN<sup>(18)</sup>

Peptona	0.1 gr
Dextrosa	0.1 gr
NaCl	0.5 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 gr
Agar	1.0 gr
Agua destilada	100 ml
Rojo de fenol	1.2 mg

Los ingredientes se mezclan y se calientan en baño de agua, ajustando el pH a 6.8; repartir 4.5 ml en tubos de 16x 150 y esterilizar a 10 libras de presión durante 10 minutos. Después, añadir a cada tubo 0.5 ml de una solución al 20 % de urea, previamente filtrada por SEITZ; inclinar los tubos y guardar en el refrigerador hasta su uso.

d). CALDO PARA PRUEBA DE ASIMILACION DE NITRATOS<sup>(3,11)</sup>

Extracto de carne	3 gr
Peptona	5 gr
KNO <sub>3</sub>	1 gr
Agar	2 gr
Agua destilada	1000 ml

Servir 1 ml en tubos de 13x100 mm con tapón de rosca y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Para determinar la reducción de nitratos, en un caldo crecido durante 24 horas a 37°C, añadir 1 ml de reactivo A de nitritos y 1 ml de reactivo B de nitritos. La aparición de un color rojo dentro de los primeros 5 minutos, indica que la prueba es positiva, si no se observa

color, deberá añadirse una pizca de polvo de zinc; si aparece un color rojo indica que la prueba es negativa, si no aparece color indica la reacción de nitratos a N<sub>2</sub> u otro producto.

e). REVELADORES PARA PRUEBAS DE REDUCCION DE NITRATOS<sup>(12)</sup>

**Reactivo A**

Acido acético glacial	50 ml
Agua	125 ml
Acido sulfanílico	1.4 gr

**Reactivo B**

Acido acético glacial	50 ml
Agua	125 ml
Dimetil-alfa-naftilamina	1 gr

Los reactivos pueden tardar toda la noche en formar una solución, la agitación frecuente ayuda.

f). TINCION DE TINTA CHINA<sup>(2,3,19)</sup>

Se necesita un frasco de tinta china comercial y agua destilada. Se coloca una gota de muestra o líquido a examinar (LCR u otro), sobre un portaobjetos, se añade una gota de tinta china diluída al 1/2-1/5 en agua destilada. Se cubre la preparación con un cubreobjetos, observándose al microscópio sin utilizar el objetivo de inmersión.

Es un método para observar la cápsula de *E. neoformans*, que aparece en blanco brillante, contrastando con el color negro circundante de la tinta china diluída.

g). 5-FLUOROCITOSINA O FLUCITOSINA<sup>(19)</sup>

Es un antimocótico activo por vía oral, que se recomienda en las infecciones sistémicas por levaduras. Inicialmente, se pusieron grandes esperanzas en este fármaco, ya que a diferencia de lo que sucedía con otros antifúngicos, sus efectos secundarios no eran muy llamativos. Sin embargo, pronto se demostró que creaba resistencias con facilidad, por lo que en la actualidad se utiliza sólo asociado a otros antifúngicos.

h). ANFOTERICINA B<sup>(19)</sup>

La anfotericina B es el único antibiótico poliénico, que en la actualidad se emplea en el tratamiento de las micosis sistémicas. Fue obtenido en 1955 a partir de *Streptomyces nodosus*, un actinomiceto del suelo, e introducido en la terapéutica antifúngica hace más de 25 años.

i). KETOCONAZOL<sup>(19)</sup>

El ketoconazol, es el primer derivado imidazólico con actividad antifúngica de amplio espectro por vía oral. Fue desarrollado en 1977 y su introducción constituyó un gran avance en la terapéutica infecciosa, ya que hasta entonces el único antifúngico de amplio espectro, útil en las micosis sistémicas era la anfotericina B, con el inconveniente de su toxicidad.

Después se crearon otros compuestos imidazólicos con propiedades antifúngicas como el MICONAZOL, ITRACONAZOL, FLUCONAZOL entre muchos otros.

j). CICLOHEXAMIDA (ACTIDIONE)<sup>(16)</sup>

Este fármaco, es un inhibidor de la síntesis de proteínas celulares, por lo que inhibe el crecimiento de levaduras e inclusive es usado contra algunos virus.

## BIBLIOGRAFIA

1. Loaiza Loeza M S. 1988. Criptococosis; *Infectologia*, Año 8, Num 8, Agosto (1988) 387-395
2. Bonifaz A., 1991. *Micología Médica Básica*; Primera Edición, Ed. Francisco Mendez Cervantes. 305-317, 446.
3. Rippon W. J., 1989. *Micología Médica*; Segunda Edición, Ed. S. Company Philadelphia. 629-656
4. Stites D. P., 1978. *Manual de Inmunología Clínica*; Primera Edición, Ed. Manual Moderno. 580-582
5. Zinsser, 1988. *Microbiología*; Décimo octava Edición, Ed. Panamericana. 1300-1306
6. Clancy-Fleischmann, 1990. Isolation of *C. neoformans gattii* from a Patient with AIDS in Southern California. *The Journal of Infectious Diseases* (1990) April 161:809
7. Koneman R. 1989. *Diagnóstico Microbiológico* Primera reimpresión Ed. Panamericana. 430-465
8. Castañón-Olivares, Ruedas Velásquez; 1988. Aislamiento de *Cryptococcus* a partir de materia fecal de palomas en la ciudad de México, D.F., UNAM. Resúmenes III Congreso Nacional de Micología. 78
9. Ríos-Rosas C.; 1991. Aislamiento e identificación de *Cryptococcus* sp. de importancia médica en aves de zoológicos. Laboratorio de Micología Médica, Facultad

de Medicina, UNAM. Memorias VI Congreso Nacional de Micología. 45

10. Denning-M. Tucker; 1990. Itraconazole in opportunistic mycoses: *Cryptococcosis* and *Aspergillosis*. J.AM. ACAD. DERMATOL. 1990; 23:602-7
11. Lennette-Balows; 1989. Manual de Microbiología Clínica, Cuarta edición, Ed. Médica Panamericana. 640-643, 1162-1164, 1334
12. Koneman R.; 1985. Micología Práctica de Laboratorio. Tercera edición, Ed. Panamericana Buenos Aires. Apendice
13. Bonifaz A.-C. Garibay; 1991. Estudio Comparativo del Diagnóstico Micológico de la Criptococosis Meníngea. LAB-acta Vol. 3 No. 2, 1991:31-35
14. Frey D.-R. J. Oldfield; 1985. A Colour Atlas of Pathogenic Fungi, 3rd. impression. Wolfe Medical Publications LTD (Lond) 79
15. Mangelschots, Lontie, Vandepitte; 1990. Atlas de Microbiologie Médicale. éditions ACCO (Belgique). 90, 92, 124
16. Pelczar M.J.; 1988. Microbiología, Segunda edición, Ed. McGraw-Hill. 516
17. Velasco Castrejón O.-J. Tay Zavala. Micología Médica, Ed. Francisco Mendez Cervantes. 209-216
18. Manual de Practicas de Laboratorio de Micología Médica. Facultad de Ciencias Químicas UASLP: 47, 48

19. Torres-Rodríguez J.M.; 1987. Micosis que afectan piel y mucosas. Ed. DOYMA 68-70
  
20. ANALYTAB PRODUCTS, 1990. Método para API 20C Clinical Yeast System For in Vitro Diagnostic Use.

