

21  
209



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

BIOTIPIFICACION DE CEPAS DE Filobasidiella  
(Cryptococcus) neoformans y gatti AISLADOS  
A PARTIR DE CASOS CLINICOS HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
MA. RUTH HERNANDEZ GOMEZ

Director de la Tesis:  
ph. D. Roberto A. Cervantes Olivares

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

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

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

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

## INDICE GENERAL

RESUMEN	1
I INTRODUCCION	3
A) Generalidades	3
B) Ecología y distribución	5
C) Características clínicas	10
D) Métodos de diagnóstico	13
E) tratamiento	17
II OBJETIVOS	18
III MATERIAL Y METODOS	19
A) Obtención de las muestras	19
B) Tratamiento de las muestras	21
C) Pruebas de identificación	22
IV RESULTADOS	28
V DISCUSION	31
VI CONCLUSIONES	34
VII BIBLIOGRAFIA	35

## RESUMEN

La criptococosis o blastomicosis europea es una infección crónica o subaguda cuyo agente etiológico es una levadura capsulada llamada C. neoformans. Ocasionalmente la criptococosis se presenta en forma pulmonar, en casos sistémicos y meníngeos debido a que tiene predilección por sistema nervioso central. El habitat natural de C. neoformans son las excretas de paloma y canario. Se ha demostrado que C. neoformans son en realidad dos levaduras diferentes: Filobasidiella neoformans variedad neoformans y Filobasidiella neoformans variedad gatti, que corresponden a los serotipos A,D, y B,C de Evans respectivamente. Una de las diferencias entre estas dos variedades es su distribución geográfica, en donde la variedad neoformans se encuentra en zonas frías y la variedad gatti en zonas tropicales y subtropicales, aunque hasta ahora no se conoce el origen natural de ésta última variedad. En 1986, Juana Rendón Rojas aisló a partir de excretas de paloma la variedad neoformans, mientras que en un caso clínico se obtuvo la variedad gatti. Con el fin de aclarar cuál es la variedad que prevalece en casos clínicos se realizó el presente trabajo, recolectando cepas aisladas de casos clínicos y biotipificándolas.

Las pruebas realizadas a las cepas fueron: tinción negativa, prueba de ureasa, crecimiento en medio de Niger, prueba de patogenicidad en ratón y prueba en el medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGA). En total fueron obtenidas 28 cepas de las cuales 25 pertenecieron a la variedad gatti y sólo 3 a

la variedad neoformans, las cuales representan el 89.39% y el 10.71% respectivamente. Los resultados indican que la variedad gatti es la que prevalece en casos clínicos por lo que es prioritario el encontrar la fuente de infección de esta variedad.

## I. INTRODUCCION

### A) Generalidades

La criptococosis, conocida tambien como torulosis, enfermedad de Busse-Buschke, blastomicosis europea y recientemente filobasidiellosis es una enfermedad de distribución mundial causada por una levadura capsulada llamada Cryptococcus neoformans (49).

La criptococosis en el hombre es considerada generalmente como una infección crónica, subaguda o aguda pulmonar, sistémica, linfanguial o meníngea debido a que tiene predilección por sistema nervioso central con invasión primaria a tracto respiratorio, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (60). La ruta de infección en humanos y animales es por la inhalación de la levadura. Recientemente se ha sugerido como medio de infección la inhalación de basidiosporas, que son las esporas del estado perfecto de C. neoformans (12, 16):

C. neoformans se encuentra en el medio ambiente, por lo que las infecciones por esta levadura son comunes. La infección humana usualmente ocurre por vía pulmonar resultando en una infección subclínica respiratoria la cual es resuelta espontáneamente por el hospedero. En aproximadamente 10% de los individuos con infección pulmonar el microorganismo pasa a sangre, causando una diseminación en el organismo que generalmente se manifiesta por meningitis. La diseminación ocurre con mayor frecuencia en pacientes con enfermedades inmunosupresoras como diabetes mellitus, leucemias, SIDA, etc. (25).

C. neoformans se considera como un patógeno oportunista ya que como anteriormente se mencionó ataca a hospederos inmunodeprimidos sin embargo, se ha observado que la infección diseminada puede desarrollarse en personas normales (21).

C. neoformans no es un hongo dimórfico, es decir, tanto en su estado parasitario como vegetativo presenta la forma levaduriforme capsulada. Existen otros géneros de Cryptococcus no patógenos que se diferencian de C. neoformans porque esta especie se desarrolla de 28-37°C y es patógena para el ratón. Características como presencia de cápsula, forma de la célula, aspecto de la colonia, producción de ureasa, asimilación de nitratos, fermentación y asimilación de azúcares nos sirven para diferenciar al género Cryptococcus de otras levaduras patógenas (1).

Hasta 1975 se consideraba que C. neoformans era una levadura imperfecta la cual pertenece a la familia Cryptococcaceae, sin embargo, de acuerdo con Van Cutsem y col. (1987) Kwong-Chung y col. demostraron en 1986 la existencia del estado perfecto de esta levadura llamándola Filobasidiella la cual pertenece a la clase de los Basidiomicetes, familia Filobasidiaceae (60). Filobasidiella presenta conexiones en "clamp" y basidias, las cuales dan origen a basidiosporas haploides (43).

Se ha establecido que C. neoformans mide de 2.5 a 14  $\mu$  de diámetro, esta variación depende de la cantidad de cápsula que se forme y del medio en que se encuentre, produciendo así células excepcionalmente grandes o pequeñas (43).

## B) Ecología y Distribución

C. neoformans se ha aislado del suelo y se asocia con excretas de pájaros, especialmente las excretas de paloma que resultan un excelente medio de cultivo. Además se encuentran en algunos otros organismos como el tracto intestinal de las cucarachas. También se ha reportado que excretas de canario contienen la levadura, la cual se convierte en organismo de vida libre después de seis días de incubación por la alcalinización y descomposición del medio debido a las bacterias en las excretas (51, 59). Los organismos son recuperados en un gran número de materia orgánica acumulada en ruinas, desvanes, cúpulas y todo aquel lugar en donde se encuentren palomas.

C. neoformans no parece infectar a las palomas que tienen una temperatura corporal de 42°C por lo que el organismo sobrevive pero no se desarrolla a esta temperatura.

La supervivencia de la levadura en excretas de paloma aumenta por el incremento de la humedad relativa, el pH, el ácido úrico, concentración de creatinina y la luz del sol por lo que de acuerdo con Ruiz y col. (1982) Hubalek determinó que la composición química de las excretas son el factor primario que influye en la distribución de C. neoformans. Sin embargo, la exposición directa al sol, especialmente en época de verano son letales para la levadura. En ambientes saprófitos la levadura presenta una cápsula muy pequeña (51)



Neilson, en 1978 observó el crecimiento de amebas entre las colonias de C. neoformans las cuales fueron identificadas como Acantamoeba polyphaga la cual mostró fagocitar a la levadura y producir cambios en las características de crecimiento y virulencia (43).

Ruíz y col. (1982) determinaron los factores biológicos que influyen en la distribución de C. neoformans en la naturaleza, encontrando que varias especies de bacterias, especialmente Pseudomonas auroginosa y Basilus subtilis aisladas de excretas de paloma inhiben el crecimiento de la levadura, probablemente por producir sustancias inhibitorias, así como Acantamoeba palestinensis que la fagocita (43).

Evans, en 1950 dividió las cepas patógenas de C. neoformans en tres tipos antigénicos, A, B y C basados en la composición capsular (14). Wilson en 1968 (62) reportó otro serotipo designándolo como D. Estos serotipos capsulares fueron obtenidos por reacciones específicas de aglutinación y precipitación en suero inmune de conejo. Recientemente se ha descrito otro serotipo llamado AD que reacciona con antisuero específico para los serotipos A y D (26).

Actualmente, C. neoformans se ha clasificado en dos variedades las cuales han sido relacionadas con los diferentes serotipos: Filobasidiella (Cryptococcus) neoformans variedad neoformans que agrupa a los serotipos A y D ; y F. neoformans variedad gatti que agrupa a los serotipos B y C de Evans .

Existen algunas diferencias entre estas dos variedades: 1) pre-

sencia de basidias y basidiosporas; 2) ausencia de la variedad gatti en algunas áreas del mundo; 3) las infecciones causadas por los serotipos B y C son más resistentes a la terapia antifungal que los serotipos A y D; 4) cada vez hay más evidencias que indican que la variedad neoformans es la única causa de criptococosis en pacientes con SIDA (30, 55).

En Octubre de 1984, se publicó un reporte sobre la distribución mundial de C. neoformans en 628 aislamientos clínicos y 97 adicionales de otro laboratorio. El 100% de las cepas aisladas de Austria, Holanda, Italia, Suecia y Japón fueron variedad neoformans. Más del 85% de las cepas provenientes de Argentina, Canadá y Estados Unidos (excepto sur de California) fueron también variedad neoformans el otro 15% fueron variedad gatti. La variedad gatti fue prevalente en Australia, Brasil, Camboya, Hawaii, sur de California, México, Paraguay, Tailandia, Nepal, Vietnam y ciudades de África Central. La variedad gatti es prevalente sólo en áreas tropicales y subtropicales. de las 725 cepas estudiadas 507 (70%) fueron serotipo A; 66 (9%) serotipo D; 48 (7%) serotipo AD; 77 (11%) serotipo C y 10 (1%) no fueron tipificados (26).

Un aspecto importante a señalar es que hasta ahora no se conoce el habitat natural de la variedad gatti.

En 1987, Shadomy y col. publicaron un trabajo con el fin de obtener datos epidemiológicos para considerar la ocurrencia de infecciones causadas por los diferentes serotipos de C. neoformans, ellos trabajaron con 323 cepas aisladas de casos clínicos de las --

cuales 276 pertenecieron a los serotipos A y D, mientras que 20 a los serotipos B y C, a los 27 restantes no se les determinó el serotipo. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro No. 1

En el cuadro se muestra que los serotipos B y C excepto por el sur de California son poco frecuentes en Estados Unidos, sin embargo, se observa que otros estados se han sumado a la lista de casos de criptococosis causados por la variedad gatti. Estos son Florida, Lousiana, Mississippi, Tennessee y Virginia. Estos resultados son compatibles con la tesis de que la variedad gatti es prevalente en áreas tropicales y subtropicales (55).

ORIGEN DE LA CEPA	No. TOTAL DE AISLAMIENTOS	REACCIONES POSITIVAS A/D	REACCIONES POSITIVAS B/C
Virginia	55	47	2
Alabama	51	45	1
Norte de California	49	44	1
Missouri	18	17	0
California	17	15	2
Texas	17	17	0
Louisiana	17	14	3
Oklahoma	13	9	1
Georgia	12	10	2
Michigan	10	7	3
Minnesota	9	8	0
Maryland	7	6	0
Tennessee	7	5	1
Arkansas	4	4	0
Florida	4	3	1
Sur de California	4	3	0
Rhode Island	3	2	0
Illinois	3	3	0
Kentucky	3	1	0
Ohio	2	2	0
Pennsylvania	2	2	0
Oeste de Virginia	2	2	0
Indiana	1	1	0
Maine	1	1	0
New York	1	0	0
NIH	4	4	0
Total en Estados Unidos	316	272	17
China	7	4	3

Cuadro No. 1 Distribución de los aislamientos clínicos de C. neoformans por estado de origen, reacciones bioquímicas y serológicas (55).

Nota: el número de cepas restantes son las reacciones no determinadas.

## Características clínicas

Según Rippon, existen cinco tipos de criptococosis, estos son:

- a) criptococosis pulmonar; b) criptococosis a nivel de sistema nervioso central (SNC); c) criptococosis cutánea y mucocutánea;
- d) criptococosis ósea y e) criptococosis visceral (49)

### a) Criptococosis pulmonar

La infección en los pulmones es en la mayoría de los casos asintomática. Los síntomas que podrían presentarse son tos, en ocasiones fiebre, dolor pleural, baja de peso, también puede producirse esputo que en raras ocasiones va acompañado de sangre.

Las lesiones en pulmones frecuentemente son bilaterales aunque también pueden aparecer en un sólo lóbulo, estas lesiones son pequeñas y forman granulomas o criptococomas.

### b) Criptococosis en SNC

Este tipo de criptococosis es más frecuente, la razón de la predilección por SNC no es muy clara. Se cree que factores nutricionales para la levadura se encuentran en este lugar. En líquido cefalorraquídeo (LCR) existen asparagina y creatinina que pueden estimular el crecimiento de C. neoformans ya que los utiliza como fuente de nitrógeno.

El síntoma común en todos los pacientes es dolor de cabeza intermitente, fiebre y rigidez en el cuello.

El granuloma criptococal en cerebro produce náuseas, vómitos,

coma, parálisis, manifestaciones oculares, también pueden producir trastornos mentales que incluyen irritabilidad, agitación, apatía, etc. (49)

El líquido cefalorraquídeo en la mayoría de los casos es claro, el conteo de células es ligeramente elevado, aproximadamente 800 células por mililitro, los linfocitos son numerosos, las proteínas varían de 40 a 600 miligramos por decilitro (valor normal de 15 a 40 mg/dl), los cloruros son bajos (183 miliequivalentes o menos) y la glucosa es bastante baja (10 mg/dl) (49).

#### c) Criptococosis cutánea y mucocutánea

El primer caso descrito de criptococosis por Busse y Buschke presentaban manifestaciones cutáneas, óseas y sistémicas pero no meníngeas. La mayoría de los casos en Estados Unidos son a nivel de SNC, pero en Europa las manifestaciones a nivel cutáneo y mucocutáneo son frecuentes (49).

Las lesiones en piel se presentan en aproximadamente 10% de pacientes con criptococosis diseminada y se ha visto que la infección a este nivel no es tan rara (59, 60).

Las lesiones que se presentan son pápulas, pústulas acneiformes o abscesos que con el tiempo se convierten en úlceras.

#### d) Criptococosis ósea

La infección ósea se presenta en un 5-10% de los casos, Cryptococcus tiene predilección por huesos largos, craneales y vértebras. Los rayos X no muestran características específicas en -

este tipo de infección (49).

e) Criptococosis visceral

En la infección diseminada varios órganos y tejidos pueden estar involucrados. Lesiones granulomatosas son producidas, las cuales semejan sintomatológica y histopatológicamente a neoplasias malignas. El corazón, testículos, próstata y ojos están frecuentemente involucrados, mientras que riñones, hígado, bazo y nódulos linfáticos no. Las lesiones en el tracto genital y genito-urinario son similares a las de tuberculosis (49).

#### D) Métodos de Diagnóstico

El diagnóstico de criptococosis es hecho usualmente por: 1) cultivo de esputo, secreción bronquial, orina, heces y sangre; 2) la observación en tinción negativa y/o 3) la demostración del antígeno criptococoal en el líquido cefalorraquídeo por aglutinación en látex cuando la infección es diseminada (47, 57, 63).

La inoculación de ratones jóvenes por vía intracraneana es un método auxiliar para el diagnóstico de la criptococosis cuando no se logra observar la levadura capsulada en las muestras clínicas (1).

#### Pruebas serológicas

El uso de pruebas cutáneas para medir la hipersensibilidad retardada en una infección micótica ha declinado, la razón es la baja especificidad de los antígenos usados e interferencia de ellos con otras pruebas de diagnóstico como la fijación de complemento.

En años recientes, varios autores han tratado de obtener mejores antígenos para una prueba cutánea en pacientes con criptococosis, estos antígenos han sido extraídos de varias fracciones de C. neoformans los cuales han dado buenos resultados (2, 23).

Una prueba simple, sensible y específica para la detección de antígenos y anticuerpos sería un importante avance para el estudio de la criptococosis. Varios ensayos serológicos han sido usados pero resultan inespecíficos y de difícil estandarización. La



utilización de métodos más sensibles como el inmunoensayo enzimático (ELISA) es importante ya que detecta la aparición, circulación, persistencia y desaparición del polisacárido capsular (54).

Los antígenos fungales provocan cambios en el diagnóstico y crean dificultades en las técnicas serológicas. La formación de células fusionadas entre células de mieloma y células de bazo sensibilizadas con un antígeno (hibridomas) proporcionan un mecanismo para la producción de anticuerpos monoclonales monoespecíficos. La producción de estos anticuerpos contra C. neoformans podría tener aplicación en el diagnóstico serológico por medio de pruebas como aglutinación, inmunoprecipitación en gel, inmunofluorescencia directa e inmunoensayo enzimático (9, 10, 22).

#### Aislamiento

Se han elaborado medios específicos que permiten el aislamiento primario de C. neoformans de ambientes contaminados que también pueden ser usados para la identificación en muestras clínicas. Según Salkin (1979) Staib, en 1982 observó que C. neoformans fué la única levadura que desarrolló una pigmentación café oscura en un medio que contenía semillas de Guizotia abyssinica (Niger). Según Healy (1977) este medio fue simplificado por Paliual y Randdhaua en 1978 proporcionando mejores resultados (24,52). Se dice que el medio de Niger puede diferenciar a las dos variedades de Cryptococcus ya que la variedad neoformans produce un pigmento café más oscuro que el producido por la variedad gatti

(52) aunque esta apreciación es muy relativa.

Fleming, en 1987, desarrolló un medio llamado SOC (solryth-oxagall-caffeic acid medium) que es usado como una prueba rápida para la diferenciación del género Cryptococcus y Candida. El SOC es un sistema sólido que favorece la producción de tubo germinativo y clamidiosporas así como la oxidación del fenol produciendo una coloración café oscura (15).

La actividad de la ureasa es una de las propiedades bioquímicas más importantes de los miembros del género Cryptococcus y basidiomicetes en general (50) En vista de las diferencias bioquímicas entre las variedades neoformans y gatti la actividad de la ureasa podría ser diferente. Se ha probado un medio modificado de urea el cual contiene glucosa, peptona, extracto de levadura y EDTA que puede diferenciar a las variedades de Cryptococcus, en un medio normal de urea la actividad de ambas variedades es la misma. La variedad gatti disminuye en 86% la actividad de la ureasa, mientras que la variedad neoformans reduce la actividad en 30%. Estos resultados pueden ser usados como criterio diagnóstico para la identificación de las dos variedades (30).

El medio hasta ahora más usado para la diferenciación de las dos variedades de C. neoformans es el medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGA). En este caso sólo la variedad gatti utiliza a la canavanina como fuente de nitrógeno. Como la canavanina resulta poco accesible para los laboratorios de diagnóstico podrían ser utilizados otros medios como el de urea modificado descrito anteriormente.

Tanto el medio de Niger como el de CGA contienen creatinina la cual es asimilada por C. neoformans por lo que se han realizado estudios para determinar el papel que juega en el metabolismo de las dos variedades. Estudios de cromatografía indican que el metabolismo de la creatinina en Cryptococcus involucra un solo paso que resulta en la producción de metilidantofina y amonio. La enzima responsable del metabolismo de la creatinina es la creatinina desaminasa. La síntesis de esta enzima esta sujeta a dos tipos de regulación: la variedad neoformans es inducida por la creatinina y reprimida por el amonio, al contrario, la síntesis de la enzima por la variedad gatti es inducida por creatinina pero no es controlada por amonio. Las excretas de paloma son ricas en amonio por lo tanto la represión de la variedad neoformans puede ser un mecanismo de control adaptativo el cual no se desarrolla en la variedad gatti (46)

## E) Tratamiento

La anfotericina B junto con la 5-fluorocitocina es el tratamiento de elección contra criptococosis, sin embargo existe un 20% de mortalidad en los pacientes tratados (19).

Se tienen datos que indican el aparente decremento de la susceptibilidad por parte de los serotipos B y C a 5-fluorocitocina, comparado con los serotipos A y D. Considerando las diferencias de susceptibilidad a 5-fluorocitocina, puede explicarse el por que, pacientes infectados con los serotipos B y C parecen ser más resistentes a la terapia antifungal, que los serotipos A y D (55). Debido a la resistencia a la terapia, se han propuesto otro tipo de tratamientos con diferentes medicamentos, como el de la combinación aminociclina y anfotericina B, el problema de esta combinación es que la minociclina presenta toxicidad para el organismo (19).

Van Cutsem, en 1987, probó "in vitro" e "in vivo" una nueva droga llamada itraconazol, en varios géneros de hongos. esta sustancia resultó ser un excelente agente contra C. neoformans, además no se observaron efectos adversos, por lo que resulta un buen candidato para la terapia, no sólo contra criptococosis, sino con otro tipo de infecciones causadas por hongos (61).

Por último, se ha sugerido el uso de anticuerpos monoclonales como terapia contra criptococosis lo cual al parecer a dado buenos resultados en modelos animales (9).

## II OBJETIVOS:

- Biotipificar las cepas de Filobasidiella (cryptococcus) aislados a partir de casos clínicos en humanos.
- Determinar cual de las dos variedades de Filobasidiella se presenta con mayor frecuencia en casos de criptococosis humana.

## III MATERIAL Y METODOS

## A) Obtención de las muestras

Las cepas de Cryptococcus fueron obtenidas de varios hospitales e instituciones las cuales fueron generosamente donadas y se muestran en la siguiente tabla:

<u>Hospital o Institución</u>	<u>No. de cepas donadas</u>
Hospital General de México	3
Centro Dermatológico Pascua	1
Hospital Infantil de México	2
Hospital de petroleos Mexicanos	1
Hospital 20 de Noviembre	1
Departamento de Ecología Humana Facultad de Medicina. UNAM	1
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas	1
Instituto de Salud de Enfermedades Tropicales	18
TOTAL	28

## B) Tratamiento de las muestras

Para obtener las cepas de C. neoformans a partir de LCR se sigue el siguiente procedimiento:

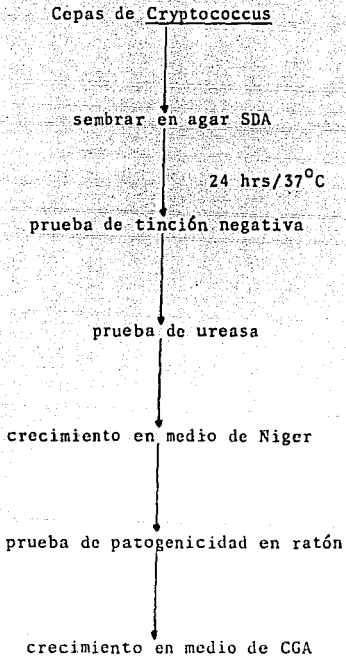
- 1.- Centrifugar la muestra de LCR a 200 rpm durante 20 min.
- 2.- Con una pipeta pasteur esteril se separa cuidadosamente

el sobrenadante.

- 3.-El sedimento se utiliza para las pruebas de diagnóstico, sembrándose en agar sabouraud dextrosa (SDA).

Nota: En este trabajo no se realizó el aislamiento de Cryptococcus a partir de LCR ya que las cepas nos fueron donadas sin embargo, la metodología usada por los laboratorios clínicos es la descrita.

Las cepas de Cryptococcus fueron tratadas como se muestra en el siguiente diagrama:





### C) Pruebas de identificación

Las pruebas de identificación que se le realizaron a la cepas fueron:

- 1.- prueba de tinción negativa
- 2.- prueba de ureasa
- 3.- crecimiento en medio de Niger (Guizotia abyssinica)
- 4.- prueba de patogenicidad en ratón
- 5.- crecimiento en medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGA).

#### 1.- Prueba de tinción negativa (1)

Esta técnica consiste en la observación directa de las levaduras capsuladas utilizando tinta china.

Metodología:

- Colocar en un portaobjetos una gota pequeña de tinta china y una gota pequeña de agua destilada.
- Suspender una pequeña parte de la muestra y mezclar en la tinta china.
- Colocar un cubreobjetos presionando ligeramente.
- Observar al microscopio buscando las levaduras capsuladas.

#### 2.- Prueba de ureasa (1, 6)

El género Cryptococcus y otras levaduras producen la enzima ureasa, esta característica provee una prueba útil para diferenciar al género Cryptococcus de otros géneros como Candida. El agar usado en esta prueba contiene rojo de fenol el cual sirve como in

dicador de la reacción alcalina que resulta cuando la urea es degradada, produciendo amonio en la reacción.

**Metodología:**

- Medio de urea de Christensen: disolver 13 g del medio de caldo de urea en 100 ml de agua destilada y esterilizar por filtración.
- Distribuir el caldo de urea en tubos esteriles, aproximadamente 1.5 ml en cada uno.
- Para llevar a cabo la prueba se toma una pequeña parte de la muestra y se suspende en el medio, incubando posteriormente a 37°C. El desarrollo de un color rosa mexicano en el tubo indica una prueba positiva la cual puede dar entre 18 y 48 hrs.

**3.- Crecimiento en medio de Niger (6)**

El crecimiento diferencial de C. neoformans en medio de Niger se ha usado como una prueba para su identificación, ya que es la única levadura en su género capaz de asimilar a la creatinina que se encuentra en las semillas de Niger, así como la producción de un pigmento café oscuro.

Una prueba positiva se obtiene con el desarrollo de colonias café oscuro en ocasiones con apariencia vidriosa y húmeda debido a la gran cantidad de material capsular presente.

Preparación del medio de Niger simplificado:

Semillas de <u>Guizotia abyssinica</u> (Niger)	50 g
Agar bacteriológico	15 g
agua destilada	1000 ml

#### Metodología:

- Pulverizar las semillas de Niger en un mezclador eléctrico y hervir por 25 min. en 1000 ml de agua destilada, filtrar a través de una gasa o papel filtro.
- Agregar 15 g de agar, llevar a un volumen de un litro con agua destilada.
- Esterilizar a 110°C por 25 min.
- Homogenizar y servir en placas o tubos

#### 4.- Prueba de patogenicidad en ratón (1)

La inoculación de ratones jóvenes (aproximadamente 3 semanas de edad) por vía intratecal es un método auxiliar en el diagnóstico de la criptococosis ya que esta levadura es la única especie en su género patógena para el ratón.

#### Metodología:

- Preparar una suspensión de las levaduras en solución salina fisiológica esteril de un cultivo de 48 hrs de crecimiento. se recomienda preparar una dilución 1:100.
- Utilizando una jeringa de insulina aspirar 0.02 ml de la suspensión de las células.
- Anestesiarse al ratón con éter o cloroformo.
- Colocar los dedos índice y pulgar de la mano izquierda sobre las orejas para inmovilizar la cabeza.
- Limpiar la piel con alcohol.
- Un poco hacia la línea media a través de la parte posterior del cráneo insertar la aguja lentamente rotando la jeringa

como un pequeño taladro entre el dedo pulgar e índice hasta que se persiva un pequeño estirón en la aguja.

- Empujar lentamente el émbolo de la jeringa para inocular 0.02 ml de la dilución.
- Repetir la inoculación por lo menos en tres ratones.

La infección se manifiesta entre los 8 y 15 días después de la inoculación, provocando en los ratones alteraciones en su comportamiento. La muerte instantánea o durante las primeras 48 hrs se debe a traumatismos causados por la inoculación.

##### 5.- Crecimiento en medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGA).

Este medio cuenta con glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, y un análogo de arginina (la canavanina), como un inhibidor selectivo. Se adiciona azul de bromotimol al medio como indicador de pH.

Su uso se basa en las diferencias bioquímicas que presentan las dos variedades de C. neoformans. Las cepas que corresponde a la variedad gatti no son inhibidas por la canavanina a diferencia del serotipo D y casi el 30% del serotipo A, cuyo desarrollo si resulta inhibido.

Las cepas de la variedad gatti pueden usar a la glicina como fuente de carbono y nitrógeno. La gaceta Newsletter (1984) menciona que de acuerdo a Kwong-Chung y col. sólo el 19% de las cepas probadas del serotipo A y 11% del serotipo D, usan glicina como fuente de carbono y de nitrógeno. Todas las cepas del sero-

tipo D que utilizan a la glicina son sensibles a la canavanina y como resultado no crecen en el medio de CGA. En cuanto a las cepas del serotipo A aunque no todas son sensibles a la canavanina y un 19% utilizan a la glicina, no crecen cuando el medio contiene a ambas: canavanina y glicina (26).

La alcalinidad indicada por el pH refleja el resultado de la producción de amonio, a su vez producto de la degradación de la creatinina, que proviene de la utilización del análogo de la arginina, la canavanina.

#### Preparación del medio de CGA

Solución A: glicina, L-canavanina

glicina	10 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{MgSO}_4$	1 g
solución vitaminada (50 )	1 gota
sulfato de L-canavanina	30 mcg
agua destilada	100 ml

La solución vitaminada puede ser reemplazada por 1 mg de tiamina-HCl. El pH final de la solución se ajusta a 5.0 y se esteriliza por filtración.

Solución B: solución del indicador

Solución acuosa de azul de bromotimol (0.4% P/V).

0.4 g de azul de bromotimol sódico

100 ml de agua destilada

Para un litro de medio:

880 ml de agua destilada

20 ml de la solución B

20 g de agar

Esterilizar por 15 min. a 15 lb/pul<sup>2</sup>. Cuando el agar se encuentre aproximadamente a 50°C se agregan 100 ml de la solución A y se mezclan sirviéndose posteriormente en cajas de petri.

Una prueba positiva es indicada por un cambio de pH 5.6 ± 0.1 (amarillo verdoso) hasta 7.0 (azul cobalto) (48).

## IV RESULTADOS

En total fueron obtenidas 28 cepas de C. neoformans a las cuales se le realizaron las pruebas de identificación y diferenciación ya descritas. En el cuadro No. 2 se muestran los resultados obtenidos para cada prueba así como el origen de cada cepa.

Como puede observarse, todas las pruebas de identificación (tinción negativa, producción de ureasa, crecimiento en medio de Niger y patogenicidad en ratón) fueron positivas.

En el caso de la prueba de patogenicidad en ratón no todos los animales presentaron alteraciones en su comportamiento lo cual nos estaría hablando de una alteración a nivel de SNC, sin embargo la mayoría de ellos murieron en un período de 5 a 30 días post-inoculación observándose lesiones licuefactas en cerebro y recuperándose las cepas en todos los casos de este órgano.

En cuanto a la prueba que diferencia a las dos variedades, neoformans y gatti (CGA), observamos que de las 28 cepas, 25 (89.29%) pertenecieron a la variedad gatti y sólo 3 (10.71%) a la variedad neoformans.

Cabe señalar que se le realizaron las mismas pruebas de identificación y diferenciación a cepas ya perfectamente serotipificadas pertenecientes al laboratorio de micología de la unidad de posgrado de la FES-Cuautitlán para usarlas como controles de las mismas pruebas. Los serotipos usados fueron: B, C, D y KCH (cepa de caso clínico perteneciente a la variedad neoformans) así como una cepa de Candida albicans usada como control negativo. Los resultados se muestran en el cuadro No. 3.

No. de cepa	Origen	prueba de tinción negativa	producción de ureasa	crec. medio de Niger	pat. en ratón	crec. medio de CGA
1	H. General	+	+	+	+	+
2	H. General	+	+	+	+	+
3	H. General	+	+	+	+	+
4	C.D.P.	+	+	+	+	+
5	H. Infantil	+	+	+	+	+
6	H. Infantil	+	+	+	+	+
7	D.E.H. UNAM	+	+	+	+	+
8	E.N.C.B.	+	+	+	+	+
9	H. Petroleros.	+	+	+	+	+
10	H. 20 de Nov.	+	+	+	+	+
11	I.S.E.T.	+	+	+	+	-
12	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
13	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
14	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
15	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
16	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
17	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
18	I.S.E.T.	+	+	+	+	-
19	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
20	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
21	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
22	I.S.E.T.	+	+	+	+	-
23	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
24	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
25	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
26	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
27	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
28	I.S.E.T.	+	+	+	+	+
TOTAL (pruebas positivas)		28	28	28	28	25

Cuadro No. 2. Resultados de las pruebas realizadas a las copas de *C. neoformans* y origen de cada cepa. Para la prueba de tinción negativa + representa la observación de levaduras con cápsula. Para el crecimiento en medio de Niger el signo + representa el desarrollo de colonias con pigmentación café oscuro. Para la prueba de patogenicidad en ratón el signo + representa lesiones en cerebro. Para las pruebas de producción de ureasa y crecimiento en CGA el signo + representa cambio de color en el medio y el signo - sin cambio.



Serotipo	Pba, de tinción negativa	producción de ureasa	crec. medio de Niger	Pat. en ratón	Crec. medio de CGA
B	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+
KCH	+	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	-	-

Cuadro No. 3. Resultado de las pruebas realizadas a los serotipos usados como controles. Los signos representan las mismas características que en el cuadro anterior para cada una de las pruebas.

## V DISCUSION

La criptococosis en México, es considerada como una enfermedad poco frecuente debido tal vez, a que en nuestro país existen pocos centros hospitalarios dedicados al diagnóstico micológico. Sin embargo, cada vez hay más evidencias que indican que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia de la que se cree, una de ellas es el trabajo realizado por Juan Manuel Paulin quien recopiló datos en un período comprendido de Enero de 1983 a Julio de 1985 en diferentes centros hospitalarios del área metropolitana para determinar las micosis más frecuentemente diagnosticadas. El observó que de las micosis superficiales se encuentran más frecuentes tiña pedis, tiña cruris, tiña unguium, tiña capitis, tiña versicolor y tiña corporis.

Con respecto a las micosis profundas, las más frecuentes fueron micetoma, esporotricosis, cromomicosis, criptococosis y coccidioidomicosis (44).

Los cuatro centros hospitalarios encuestados por Paulin fueron el Centro Médico Nacional, Hospital General, Centro dermatológico Pascua y Hospital de la Raza, en ellos se encontraron un total de 20 casos de criptococosis distribuidos de la siguiente manera:

Centro Médico Nacional	12
Hospital General	2
Centro Dermatológico Pascua	0
Hospital de la Raza	6

No se ha realizado un estudio epidemiológico completo sobre la criptococosis en nuestro país, pero existen reportes aislados como el de Juana Rendón R. quien en 1986 llevó a cabo el aislamiento de C. neoformans a partir de excretas de paloma con el fin de obtener cepas nativas ya que no existían datos sobre el biotipo presente en su habitat natural. Para ello se recolectaron 118 muestras de excretas de paloma en los estados de México, Hidalgo y D.F. recuperando de ellas 17 cepas de C. neoformans las cuales biotipificaron y determinaron que todas pertenecían a la variedad neoformans. En este mismo trabajo se reporta también una cepa aislada de un paciente del Hospital Infantil la cual también fue biotipificada determinando que la variedad en este caso fue gatti (48).

En el número 44 de la gaceta Newsletter (26) se informa que la variedad presente en México es la gatti. En la referencia escrita al respecto mencionan solamente una cepa aislada de caso clínico lo cual coincide con lo reportado por Juana Rendón sobre el biotipo presente en este tipo de muestras, sin embargo, dos datos reportados de C. neoformans variedad gatti consideramos que no son suficientes para afirmar que en México es prevalente esta variedad, más aún, cuando se ha reportado que la variedad presente en excretas de paloma es neoformans por lo que consideramos necesario realizar el trabajo presentado aquí con el fin de determinar la variedad prevalente en casos de criptococosis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es evidente que la variedad prevalente en casos clínicos es gatti.

Como se mencionó anteriormente, hasta este momento sólo se conocían dos reportes que indicaban que la variedad prevalente era gatti. Con los datos obtenidos aquí se confirman estos resultados.

Aparentemente la fuente de infección principal no se encuentra en las excretas de paloma ya que como reporta Rendón (48), - en este tipo de muestras solo se encuentra la variedad neoformans que en los casos clínicos reportados aquí, representan solamente el 10.71% por lo que clínicamente es más importante la variedad gatti la cual representa el 89.39% de los casos estudiados.

La cantidad de casos de criptococosis atribuidos a la variedad gatti hacen prioritario el encontrar la fuente de infección de esta variedad, aunque hasta ahora no se tiene ningún indicio de cual pudiese ser su habitat natural (26).

Con las cepas nativas ya biotipificadas, es posible hacer un antígeno más específico para el diagnóstico preciso de criptococosis, ya que probablemente los antígenos usados hasta hoy son inespecíficos, debido a que no se sabe de que serotipo provienen, dando entonces, resultados falsos negativos.

Al mismo tiempo, es importante conocer la variedad presente - en casos clínicos, ya que así puede darse una terapia adecuada, - tomando en cuenta, que la variedad gatti es resistente a 5-fluorocitocina, la cual sigue utilizándose como tratamiento de elección junto con anfotericina B (19, 55).

## VI CONCLUSIONES

- 1.- La variedad prevalente en casos de criptococosis en México es la gatti, por lo que aparentemente la fuente de infección no son las excretas de paloma ya que en este tipo de muestra sólo se encuentra la variedad neoformans.
- 2.- Es evidente que la variedad gatti es más importante en los casos clínicos ya que representan el 89.39% de los casos estudiados aquí, por lo que resulta apremiante el encontrar el habitat natural de esta variedad.
- 3.- Al conocer la variedad que prevalece en casos de criptococosis en humanos pueden hacerse antígenos más específicos para el diagnóstico serológico, así como el buscar terapias más adecuadas contra esta enfermedad.

## VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alba Flores J., Argüello Licea B., Garza Garza D., Martínez Martínez M.E., Trujillo González A. (1985). Manual de Micología. E.N.C.B.
- 2.- Bennet E.J. (1971). Cryptococcal skin test antigen: preparation variables and characterization. Infection and Immunity. 32: 373-380
- 3.- Bhattacharjee A.K., Kwong-Chung J.K., and Glaudemans J.P.C. (1979). On the structure of capsular polysaccharide from Cryptococcus neoformans serotype C-II. Molecular Immunology. 16: 531-532
- 4.- Blackstock Rebecca, McCormack M.J., Hall K. Nancy. (1987). - Induction of a macrophage-suppressive lymphokine by soluble cryptococcal capsular antigens and its association with models of immunologic tolerance. Infection and Immunity. 55(1):233-239
- 5.- Breen J., Lee C.Ira, Vogel F.F., and Friedman H. (1982). - Cryptococcal capsular polysaccharide-induced modulation of murine immune responses. Infection and Immunity. 56(1): 47-51
- 6.- Campbell Mary. Stewart Joyse. (1980). The Medical Micology - Handbook. Wiley Medical Publication: 205
- 7.- Cherniak R., Reiss E., Slodki E.M., Plattner D.R. and Blumer O. (1980) Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of Cryptococcus neoformans serotype A. Molecular Immunology. 17: 1025-1052.
- 8.- Domer E. Judith, Lyon L.F., and Murphy W.J. (1983). Cellular immunity in cutaneous model of cryptococcosis. Infection and Immunity. 40(3): 1052-1059

- 9.- Dromer Françoise, Charreire Jeannine, Contrepois A., Carbon Claude and Patrick Yeni (1987). Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-Cryptococcus neoformans monoclonal antibody. Infection and Immunity. 55(3): 749-752
- 10.- Dromer F., Salamero Jean, Contrepois A., Carbon Claude and Patrick Yeni. (1987). Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide. Infection and Immunity. 55(3): 742-748
- 11.- Duke Schener and Fromtling A.R. (1984). Effects of diethylstilbestrol and cyclophosphamide on the pathogenesis of experimental Cryptococcus neoformans infections. Sabouraudia. 22: 125-135
- 12.- Dykstra A.M. and Friedman Lorraine. (1978). Pathogenesis, lethality, and immunizing effect of experimental cutaneous cryptococcosis. Infection and Immunity. 20(2): 446-456
- 13.- Eckert F.T., and Kozel R.T. (1987). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide. Infection and Immunity. 55(8): 1895-1899
- 14.- Evans E.E.(1950).The antigenic composition of Cryptococcus neoformans. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reaction. Journal of Immunology. 64: 423-430
- 15.- Fleming H.W., Knezek L. Karen and Dorn L.G.(1987). Evaluation of SOC the presumptive identification of Candida albicans and Cryptococcus neoformans. Mycopathologia. 97: 25-31

- 16.- Fung Y.P. and Murphy W. Juneann (1982). In vitro interaction on immune lymphocytes and Cryptococcus neoformans. Infection and Immunity. 36(3): 1128-1138.
- 17.- Graybill R.J. and Drutz J.D. (1978). Host defense in Cryptococcosis. II. Cryptococcosis in the nude mouse. Cellular Immunology. 40: 263-274
- 18.- Graybill R.J., Hague M. and Drutz J.D. (1981). Passive immunization in murine cryptococcosis. Sabouraudia. 19: 237-244
- 19.- Graybill R.J. and Mitchel Linda (1980). Treatment of murine cryptococcosis with Minocycline and amphotericine B. Sabouraudia. 18: 137-144
- 20.- Graybill R.J., Mitchel Linda and Drutz J.D. (1979). Host defense in cryptococcosis. III. Protection of nude mice by thymus transplantation. Infection and Immunity. 22: 546-552
21. Gupta Sudhir, Ellis M., Cesario T., Rulning Merilee and Vayuvula Bharathi. (1987). Disseminated cryptococcal infection in a patient with hypogammaglobulinemia and normal T cell functions. - The American Journal of Medicine. 18: 129-131
- 22.- Hall K. Nancy and Blackstock Rebecca (1981). Production of specific antibody to Cryptococcus neoformans by hibridomas in vitro. Sabouraudia. 19: 157-160
- 23.- Hay J.R. and Reiss E. (1978). Delaye-type hypersensitivity responses in infected mice elicited by cytoplasmic fractions of Cryptococcus neoformans. Infection and Immunity. 22(1): 72-79
- 24.- Healy E.M., Dillavou L.C., Taylor E.G. (1977). Diagnostic medium containing inositol, urea and caffeic acid for selective growth of Cryptococcus neoformans. Journal of Clinical Microbiology. 4(4): 387-391



- 25.- Hidore R.M. and Murphy W.J. (1986). Correlation of Natural killer cell activity and clearance of Cryptococcus neoformans from mice after adoptive transfer of splenic nylon wool-nonadherent cells. Infection and Immunity. 51(2): 547-555
- 26.- ISHAM (International Society for Human and Animal Microbiology). (1984) Research notes. Mycoses Newsletter. No. 44 October.
- 27.- KOZEL R.T. (1983). Dissociation of a hydrophobic surface from phagocytosis of encapsulates and non-encapsulates Cryptococcus neoformans. Infection and Immunity. 39(3): 1214-1219
- 28.- Kozel R.T., Gotschlich C.E. (1982). The capsule of Cryptococcus neoformans passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. Journal of Immunology. 29(4): 1675-1680
- 29.- Kozel R.T. and MacGaw G.T. (1979). Opsonization of Cryptococcus neoformans by human immunoglobulin G. Role of immunoglobulin G in phagocytosis by macrophages. Infection and Immunity. 25(1): 255-261
- 30.- Kong-Chung J.K., Wickes L.B., Booth J.L., Vishniac S.H. and Bennet E.J. (1987). Urease inhibition by EDTA in the two varieties of Cryptococcus neoformans. Infection and Immunity. 55(8): 1751-1754
- 31.- Lim S.T. and Murphy W.J. (1980). Transfer of immunity to cryptococcosis by T-enriched splenic lymphocytes from Cryptococcus neoformans sensitized mice. Infection and Immunity. 30: 5-11
- 32.- McGaw T. and Kozel R.T. (1979). Opsonization of Cryptococcus neoformans by human immunoglobulin G. Masking of immunoglobulin G by cryptococcal polysaccharide. Infection and Immunity. 25: 262-267

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 33.- Miller P. G. and Puck Jennifer (1984). In vitro human lymphocyte responses to Cryptococcus neoformans evidence from primary - and secondary responses in normals and infected subjects. Journal of Immunology. 133(1):166-172
- 34.- Monga P.D. (1981). Role of macrophages in resistance to experimental cryptococcosis. Infection and Immunity. 32(3): 975-978
- 35.- Morgan A. Margie, Blackstock A.R., Bulmer S.G. and Hall K. - Nancy. (1983). Modifications of macrophages phagocytosis in murine cryptococcosis. Infection and Immunity. 40(1): 493-500
- 36.- Mosley L.R., Murphy W.J. and Cox A.R. (1986). Immunoadsorption of Cryptococcus-specific suppressor T-cell factors. Infection and Immunity. 51(3): 844-850
- 37.- Murphy W.J. and McDaniel Olga (1982). In vitro reactivity of natural killer (NK) cells against Cryptococcus neoformans. Journal of Immunology. 128(1): 276-282
- 38.- Murphy W.J. and Moorhead W.J. (1982). Regulation of cell-mediated immunity in cryptococcosis. I. Induction of specific afferent T suppressor cells by cryptococcal antigen. Journal of Immunology. 128(1): 276-282
- 39.- Murphy W.J., Mosley L.R. (1985). Regulation of cell mediated immunity in cryptococcosis. III. Characterization of second order T suppressor cells (Ts2)<sup>1</sup>. Journal of Immunology. 134(4): 577-583
- 40.- Nabavi Nasrin and Murphy W.J. (1985). In vitro binding of natural killer cells of Cryptococcus neoformans targets. Infection and Immunity. 50(1): 50-57
- 41.- Nabavi N. and Murphy W.J. (1986). Antibody-dependent natural killer cell-mediated growth inhibition of Cryptococcus neoformans

Infection and Immunity. 51(2): 556-562

42.- Negroni R. and Finquelievich L.J. (1987). Cryptococcosis - subaguda experimental en ratas wistar. Medicina (buenos Aires). 47: 133-138

43.- Neilson B.J., Ivey H.N., and Bulmer S.G. (1978). Cryptococcus neoformans: pseudohifal formans surviving culture with Acanthamoeba polyphaga. Infection and Immunity. Vol 20 (1) 262-266

44.- Paulin Alba J.M. (1985). Encuesta en los centros de diagnóstico micológico del área metropolitana y aspectos epidemiológicos de las micosis más frecuentes diagnosticadas de 1983 a 1985. Tesis Licenciatura. Q.F.B. FES-Cuautitlán.

45.- Perfect R.J. and Durack T.D. (1985). Effects of cyclosporine in experimental cryptococcal meningitis Infection and Immunity 50(1): 22-26

46.- Polacheck I. and Kwong-Chung J.K. (1980). Creatinine metabolism in Cryptococcus neoformans and Cryptococcus basillisporus. - Journal of Bacteriology 42(1): 15-20

47.- Prevost Elenea and Newell Rebecca (1978). Commercial cryptococcal latex kit: clinical evaluation in a Medical Center Hospital. Journal of Clinical Microbiology. 529-533

48.- Rendon Rojas M.C.J. Aislamiento de Cryptococcus neoformans a partir de excretas de paloma y gallina. Tesis de Licenciatura Q.F.B. FES-Cuautitlán. UNAM. 1986

49.- Rippon W. J. Medical Micology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. W.B. Saunders Company. 1974: 205-213

50.- Roberts D.G., Horstmeier D.C., Land A.G., and Foxwoth H.J.

- (1978). Rapid urea broth test for yeast. Journal of Clinical Microbiology. 7(6): 584-588
- 51.- Ruiz A., Neilson B.J. and Bulmer S.G. (1982). Control of Cryptococcus neoformans in nature biotic factors. Sabouraudia. 20: 21-29
- 52.- Salkin F.I. (1979). Further simplification of the Guzitia abyssinica seed medium for identification of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus basillispora. Can. Journal Microbiology. 25: 1116-1118
- 53.- Schoneyder H. and Stenderup A. (1982). Isolation of Cryptococcus neoformans from pigeon manure on two media inducing pigment formation. Sabouraudia. 20:193-197
- 54.- Scott Nan E., Muchmore G.H. and Felton G.F. (1981). Enzyme linked immunoadsorbent assays in murine cryptococcosis. Sabouraudia. 19: 257-265
- 55.- Shadomy J.H., Wood-Helie S., Shadomy S., Dismukes E.W., Chau Y.R. and NIAID mycoses study group. (1987). Biochemical serogrouping of clinical isolates of Cryptococcus neoformans. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 6: 131-138
- 56.- Sotomayor E. Claudia, Rubinstein R.H., Rivera M. Celia and Masih T. Diana. (1987). Immunosuppression in experimental cryptococcosis in rats. Induction of afferent T suppressor cells to a non-related antigen. Journal of a Medical and Veterinary Mycology. 25: 67-75
- 57.- Staib F. (1986). Detection of Cryptococcus neoformans in biopsy specimens from the splees and liver of AIDS patients: Cryptococcal comments. Mykosen. 29(12): 551-555

- 58.- Swenson J.F. and Kozel R.T. (1978). Phagocytosis of Cryptococcus neoformans by normal and thioglycolate-activated macrophages. Infection and Immunity. 21(3): 714-720
- 59.- Van Cutsem J., Fransen J., Van Gerven F. and Janssen J.A.P. (1986). Experimental cryptococcosis: dissemination Cryptococcus neoformans and dermatotropism in guinea pigs. Mykosen. 29(12). 561-575
- 60.- Van Cutsem J., Van Gerven F., Fransen J., and Janssen J.A.P. (1986). New guinea pig model of disseminated cryptococcosis associated with dermatotropism. Models in Dermatology. 3: 180-189
- 61.- Van Cutsem J., Van gerven F., Janssen J.A.P. (1987). Activity of orally, topically and parenterally administered Itraconazole in the treatment of superficial and deep mycoses: animal models Reviews of Infectious Diseases. 9, supplement 1: s15-s31
- 62.- Wilson D.E., Bennet J.E. and Bailey J.W. (1968). Serologic grouping of Cryptococcus neoformans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127: 820-823
- 63.- Wood E. and Wong C.H.P. (1987). Recurrent meningitis of five years duration due to Cryptococcus neoformans. Tropical and Geographical Medicine. 39: 67-69