

TESIS
QW180.5.D
L4

MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL"
DEPARTAMENTO DE MICOLOGÍA

SEROTIPIFICACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* MEDIANTE
TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN EN PLACA.



AUTORES:

Lic. Lemus E., Druvic.
Lic. Rodríguez P., Fabiola.
Dra. Ruiz D., Angela.

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA

Caracas, Diciembre de 1999

INDICE

	Pág.
1.- Introducción	1
2.- Objetivos e Hipótesis	9
3.- Materiales y Métodos	10
4.- Resultados	14
5.- Discusión	15
6.- Conclusiones y Recomendaciones	17
7.- Referencias Bibliográficas	19
8.- Anexos	25



RESUMEN

La criptococosis es una micosis profunda, diseminada causada por la levadura encapsulada *C. neoformans* que se comporta como oportunista dado que requiere de la alteración de las defensas del huésped para establecer la infección.

La estructura antigénica de la levadura resulta ser un inmunógeno pobre en humanos y en animales de experimentación, por lo que la producción de anticuerpos específicos ocurre solo en una parte de los pacientes con criptococosis y los títulos son usualmente bajos.

Esta enfermedad ha aumentado en los últimos años debido al incremento en el número de casos de infección por VIH, en virtud de esto y de que existen pocos datos epidemiológicos en cuanto a la frecuencia de los diferentes serotipos de *Cryptococcus neoformans* a nivel nacional, se propuso la implementación por primera vez de una técnica de aglutinación en placa con sueros hiperinmunes específicos para cada serotipo que permitieran facilitar la serotipificación de los aislados de *Cryptococcus neoformans* y poder establecer una casuística en nuestro medio.

Los resultados mostraron títulos bajos en los sueros obtenidos para todos los serotipos estudiados, debido a la poca respuesta inmune en los conejos (modelo experimental).

Se considera necesario realizar estudios posteriores que permitan continuar la investigación para lograr el objetivo planteado.



AGRADECIMIENTOS

1. A nuestra tutora Lic. Maribel Dolande, por su apoyo y por dar lo mejor de ella en beneficio de nuestro aprendizaje.
2. A la Lic. Beatriz Maldonado por servir como apoyo moral y por estar siempre a la disposición para aclarar nuestras dudas.
3. Al personal del Departamento de Micología del INHRR, por su colaboración en el trabajo de laboratorio.
4. Al Dr. Manuel Moya, veterinario del INHRR, por su colaboración en el manejo de los animales de experimentación de este trabajo.
5. Al personal de la granja La Torcaz, por abrimos un espacio en su trabajo diario.
6. A la Coordinación de Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Servicios Generales del INHRR por facilitarnos el transporte a la granja.
7. A la Lic. Mireya Mendoza, por facilitarnos las cepas de referencia.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La Criptococosis es una micosis profunda, diseminada, de evolución crónica, subaguda, rara vez aguda, causada por la levadura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, que se comporta como oportunista dado que el microorganismo requiere de la alteración de las defensas del huésped para establecer la infección.

La incidencia de manifestaciones clínicas en la infección por *Cryptococcus neoformans* es alta en individuos infectados por HIV o que tienen otras deficiencias inmunes (linfomas) u otras enfermedades de base (Diabetes, TBC, Histoplasmosis) así como en individuos inmunocompetentes; si bien en éste último grupo se ha descrito enfermedad, su ocurrencia es relativamente rara y se sospecha que se deba a alta carga del inóculo o a alta virulencia de la cepa infectante.(29).

En nuestro país es la tercera micosis profunda generalizada más frecuente después de Histoplasmosis y Paracoccidioidomicosis, según estadística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene.

La enfermedad se adquiere por la inhalación de las esporas, siendo el pulmón el primer órgano afectado por el microorganismo, pudiendo iniciarse como una infección pulmonar generalmente asintomática y autolimitada, con tendencia a diseminarse por vía hematógica, afectando otros órganos y sistemas, con especial predilección por el Sistema Nervioso Central. (33).

La enfermedad del sistema nervioso central es la forma clínica diagnosticada con mayor frecuencia, ya que el microorganismo tiene una predilección por este tejido que se ha relacionado con factores aún no bien determinados como: una menor respuesta celular fagocítica, factores nutricionales en LCR que pueden estimular su desarrollo (fuentes de nitrógeno) y ausencia de factores inhibidores en LCR como complemento y factor anticriptocóccico soluble. El comienzo es lento e insidioso y las formas abruptas o fulminantes por lo general son raras. Se manifiesta como meningitis, meningoencefalitis o criptococoma.

De un 10 a 15 % de los pacientes con criptococosis diseminada desarrollan lesiones cutáneas (pápulas, pústulas o nódulos que crecen y se ulceran). En menos del 5% se producen lesiones mucosas.

En un 5 a 10% de los pacientes se produce afección ósea, lesiones osteolíticas únicas o múltiples (cráneo, vértebras o fémur), con dolor y tumefacción local.

Cryptococcus neoformans es un hongo patógeno oportunista de gran importancia clínica y responsable de la meningo-encefalitis diseminada en la mayor parte de los pacientes con defectos inmunes y en los últimos años en la panepidemia por HIV (en un 10 % de los pacientes). (27).

En los exámenes directos de las muestras clínicas teñidos con tinta china lo observamos como una levadura encapsulada, no micelial, de 4 a 8 micras de diámetro, rodeada por una cápsula mucoide de 1 a 10 micras de espesor, que se evidencia como un halo claro porque no toma el colorante.

En cultivo Agar Sabouraud con antibióticos crece bien a 37° C en aproximadamente 72 horas. Las colonias son blanco amarillentas, lisas, brillantes, mucosas. En el examen microscópico se presenta como células esféricas o globosas, aisladas o en pares con gemación única o doble, rodeada por la cápsula.

Otros métodos para su identificación incluyen: asimilación de Inositol, hidrólisis de urea (ureasa +), falta de producción de micelio en com meal agar, crecimiento a 37° pero no a 42°, fermentación negativa, utiliza galactosa pero no lactosa, ni nitrato de potasio.

C. neoformans presenta 2 estructuras externas distintas, la pared celular compuesta por Glucanos y Mananos como principales polisacáridos (grupo VI de Bartnicki-García) y la cápsula como la capa más externa, un polisacárido compuesto de xilosa, manosa, ácido glucurónico y grupos O-acetil, que le confieren características químicas, bioquímicas, antigénicas y de virulencia particulares.(31). Así mismo otro factor de virulencia es la habilidad de *C. neoformans* de producir melanina, (por una enzima fenol oxidasa de membrana) cual parece tener un efecto protector para la célula fúngica del ataque oxidativo por parte de las células del huésped.

La cápsula induce una baja respuesta de anticuerpos, encontrándose estrecha relación entre su presencia y el grado de virulencia. Las cepas muy encapsuladas son más virulentas y ésta virulencia disminuye proporcionalmente en el grado en que disminuye la cápsula.(31) Hay evidencias que señalan que altas concentraciones de azúcar y osmolaridad en el medio son capaces de suprimir la formación de la cápsula.(31)

La cápsula de *C. neoformans* puede actuar como un escudo protector contra la acción de enzimas líticas de los fagocitos debido a que su composición química muestra alta resistencia a la enzimolisis.

Otra propiedad importante de los polisacáridos capsulares es la inhibición de la fagocitosis por leucocitos y macrófagos. Esto ocurre a través de dos mecanismos: por activación de la vía alterna del complemento en ausencia de opsoninas séricas, el otro mecanismo es dependiente de IgG (principal opsonina sérica), que facilita la fase de adherencia de la fagocitosis y en forma indirecta activa la vía alterna del complemento. Se plantea que el polisacárido capsular actúe impidiendo la fase de adherencia de fagocitosis, ya sea por inhibición o interferencia en la acción opsonizante de IgG. Se ha demostrado que la adherencia de *Cryptococcus* opsonizados por macrófagos es inhibida por bloqueo con IgG antimacrófagos. (19)

La estructura antigénica del polisacárido de la levadura resulta ser un inmunógeno pobre, tanto para el hombre como para animales de experimentación, por lo que se ha señalado como un factor contribuyente para que la producción de anticuerpos específicos ocurra solo en una parte de los pacientes con criptococosis y en títulos usualmente bajos. (6-18).

Esta característica específica ha hecho difícil la obtención de anticuerpos específicos anti-*Cryptococcus neoformans* útiles en el desarrollo de técnicas para el diagnóstico rápido como las de aglutinación, en especial aquellas asociadas al látex y otras novedosas como los ensayos inmunoenzimáticos e inmunofluorescencia.(16-17)

Se ha demostrado desde el punto de vista bioquímico que la complejidad y diversidad estructural de los diferentes polisacáridos que constituyen la cápsula y los

diferentes grados de acetilación de las cadenas laterales determinan la presencia de los serotipos cuya complejidad estructural aumenta del serotipo D al A, B, C (siendo D el más fuertemente acetilado). (10-11) (13-15)

Mediante pruebas de aglutinación y precipitación en los componentes de la cápsula se describen los serotipos B, C y posteriormente los serotipos A, D. Más recientemente se ha descrito un tercer serotipo AD que presenta una estructura química en su polisacárido capsular muy similar a los serotipos A y D, sugiriendo que pequeñas diferencias en la relación molar y patrones de enlace de los monosacáridos en la cadena de polisacáridos puedan ser responsables de sus diferentes especificidades. (35)

Los serotipos A-D se relacionan con *C. neoformans* var. *neoformans* (edo. anamorfo) o *Filobasidiella neoformans* (edo. teleomorfo), mientras que los serotipos B-C se relacionan con *C. neoformans* var. *gattii* (edo. anamorfo) o *Filobasidiella bacillispora* (edo. teleomorfo).

El crecimiento en medio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB), proporciona uno de los métodos más confiables para la diferenciación de las dos variedades de *C. neoformans*. La positividad de la prueba se evidencia por el cambio de color del medio de verde manzana (pH 5,8) a azul intenso (pH 7.0).

Los serotipos B y C de *C. neoformans* estudiados por análisis molecular y PCR son genéticamente homogéneos y están estrechamente relacionados, siendo capaces

de asimilar glicina y ser resistentes a canavanina por lo que dan una prueba positiva.(21-26)

Otras pruebas utilizadas para la diferenciación de las dos variedades incluyen la capacidad de *C. neoformans* var. *gattii* de asimilar prolina como fuente de nitrógeno y asimilar D-triptófano, propiedades que no posee la var. *neoformans* .(25)

Estos serotipos presentan diferencias considerables en su conducta ecológica, epidemiológica y curso clínico en la infección humana.

Cryptococcus neoformans var. *neoformans*, serotipos A-D y AD, (siendo A más frecuente que D), afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos por SIDA, enfermedad de base o tratamiento inmunosupresor, con una alta letalidad y poca respuesta al tratamiento. Desde el punto de vista epidemiológico tiene distribución mundial y su nicho ecológico se encuentra relacionado con la presencia de aves (palomas) y sus excretas en el suelo, así como desechos de los nidos, donde encuentran un substrato alcalino rico en nitrógeno y sal. Recientemente se ha demostrado un nuevo hábitat natural para *C. neoformans* var. *neoformans* sobretodo relacionado a su estado teleomorfo *F. neoformans*, asociado con nichos resultantes de biodegradación natural de la madera que provee un substrato favorable para su crecimiento, sin estar asociado a una especie particular de árbol. Existen reportes en la literatura donde se señala al serotipo D predominando en algunas áreas de Europa como Italia, Dinamarca y Suiza. Así mismo los serotipos A-D se han encontrado en mayor porcentaje en pacientes con infección por HIV sin presentar diferencias entre ambos en cuanto a categorías para SIDA, edad, sexo o conteo CD4. (23-34)

Mientras que *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B-C) causa enfermedad severa pero con baja mortalidad en personas sanas, encontrándose distribuido en áreas tropicales y subtropicales provistas de especies de árboles de *Eucalyptus* principalmente *E. camaldulensis*, principalmente en países como Australia, Sur de California y México. Aún cuando estos serotipos no tienen un hábitat determinado. (1)

En Colombia se han realizados estudios en la ciudad de Cúcuta (noreste del país) donde hay un alto número de casos clínico por *C. neoformans* var. *gattii*, principalmente serotipo C. Habiéndose aislado esta variedad en detritus de árboles de almendros en dicha ciudad. (3)

En Venezuela han sido estudiados casos procedentes de diversas regiones del país, siendo las de mayor endemicidad: Táchira, Zulia, Monagas, Distrito Federal y Estado Miranda, sin predilección por grupos etarios o sexo.

Reportes de datos venezolanos (primer estudio hecho en el país en 1989), revelaron *C. neoformans* var. *neoformans* 63% serotipo A, 1% serotipo D. *C. neoformans* var. *gattii* 29% serotipo B. (35)

En virtud de que existen pocos datos a nivel nacional y que el número de casos de Criptococosis ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a la prevalencia de infección por VIH, el presente trabajo tiene como finalidad serotipificar cepas de *C. neoformans* para caracterizar los serotipos existentes en nuestro país, utilizando la prueba de aglutinación en placa con sueros hiperinmunes de conejo producidos a partir de cepas de cada uno de los serotipos, lo que nos permitirá

conocer la frecuencia de éstos en los aislados de pacientes con criptococosis en el futuro y establecer casuística nacionales, los que constituye un aporte epidemiológico nacional al poder delimitar mejor las posibles fuentes de infección y tomar las medidas de control necesarias.

OBJETIVOS
E
HIPOTESIS.

OBJETIVOS

Dr. Juan Martínez

Estudiar la frecuencia de las variaciones de un rasgo en un grupo de individuos, así como su herencia y su relación con el ambiente.

Objetivo específico

OBJETIVOS

E

HIPOTESIS

Hipótesis

La variación de χ es afectada por el ambiente así como por el genotipo (genotipo A) por lo que deberíamos observar una gran frecuencia en nuestro estudio.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la frecuencia de las variedades de *Cryptococcus neoformans* en pacientes con criptococosis.

Objetivos Específicos:

1. Producción de sueros hiperinmunes anti *Cryptococcus neoformans* específicos para cada serotipo conocido.
2. Estandarizar la técnica de aglutinación en microplaca para la serotipificación de las variedades de *Cryptococcus neoformans*.

Hipótesis

La variedad de *C. neoformans* principalmente aislada es la var. *neoformans* (serotipo A) por lo que deberíamos obtener ésta con mayor frecuencia en nuestra casuística.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio transversal – descriptivo en el cual se inmunizaron conejos utilizando 4 cepas de *C. neoformans*: serotipos A,B,C,D Instituto de Medicina Tropical e Higiene de Londres, donadas por el Instituto de Biomedicina, Caracas. Para la obtención de sueros hiperinmunes y evaluar dicha respuesta por técnica de aglutinación en placa.

TRATAMIENTO DE LA CEPA, CULTIVO E IDENTIFICACION.

Estas cepas fueron repicadas y corroboradas en su clasificación por examen directo con tinta china y posteriormente con los medios cromogénicos (Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol®).

Las cepas se mantuvieron con repiques sucesivos en agar Sabouraud Dextrosa con Antibiótico a Temperatura 37° C por 48 h.

OBTENCION DE SUEROS HIPERINMUNES.

POBLACION INMUNIZADA

4 conejos machos, adultos, de 3 Kg. de peso, blancos (albinos) de Nueva Zelandia, fueron suministrados por el Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel, (granja" La Torcaz". San Diego de los Altos), el cual cuenta con personal calificado y estructura física necesaria para el buen mantenimiento y sobrevivencia de

estos animales, según los estándares del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y la Asociación Protectora de Animales.

Fueron mantenidos con una dieta convencional a base de conejarina (Comercial), suplementada con: Letisan ®, Vitamina C y Pecutrin ® (complejo vitamínico), además de agua fresca. Los conejos fueron evaluados semanalmente durante el proceso de investigación, para comprobar sus condiciones físicas.

ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN:

Previo a la inmunización los animales fueron sangrados para determinar valores de IgG basales.

La inmunización se realizó por vía endovenosa (vena marginal de la oreja) con 1 ml de una suspensión de *C. neoformans* serotipos A, B, C y D uno para cada conejo, a una concentración de 8.0 Mc farland (24×10^8 UFC/ml) (2) una vez por semana por 4 semanas consecutivas, aplicando una dosis de refuerzo a los 15 y 30 días de la última sensibilización.

Los conejos fueron sangrados a la 4^a, 6^a, 8^a y 10^a semana para la obtención de los sueros hiperinmunes, previa evaluación clínica.

PREPARACION DEL INOCULO

- ♦ Se partió de una siembra de 48 horas incubada a 37°C (tubo de ensayo con medio de cultivo y siembra), se le añadieron 10 ml de formalina 0.5% y se dejó reposar por 24 horas.

- ♦ Se homogeneizó con Pipeta Pasteur, extrayendo la suspensión para añadir en un tubo de centrifuga. Se centrifuga a 5000rpm por 15 min. Descartando el sobrenadante.
- ♦ Resuspender con 10 ml de solución salina estéril. Centrifugar nuevamente.
- ♦ Repetir el paso anterior, por un mínimo de 3 veces.
- ♦ Tomar una asada para repicar en medio de Agar Sabouraud mas Cloranfenicol para verificar la viabilidad de la cepa, incubando a 37° C por 72 horas.
- ♦ Se preparó la suspensión a concentración de 8 Mc Farland en solución salina.
- ♦ De esta suspensión se tomó 1 ml para inoculación de los animales.

MEDICION DE LA RESPUESTA INMUNE.

En toda prueba realizada se utilizó un control negativo (suero de conejo no inmunizado).

IgG: Una vez obtenido el suero hiperinmune del conejo (10^{ma} semana post inmunización), se determinó la concentración total de Inmunoglobulina G por el método de turbidimetria (Equipo Automatizado ACA IV- Dupont de Venezuela) ®, para establecer comparación con los valores basales.

AGLUTINACIÓN EN MICROPLACA:

Con los sueros hiperinmunes se ensayó la técnica de aglutinación en microplacas, según la técnica de aglutinación estándar para Brucelosis, adaptándola a *Cryptococcus*, después de varios ensayos.

Se procedió a preparar una suspensión de cada uno de los serotipos de *Cryptococcus neoformans* a concentraciones entre 1, 2, Y 3 Mc. Farland, para

estandarizar la concentración del antígeno. Encontrando que la concentración ideal fue 2 Mc farland.

A la suspensión preparada se le colocó Safranina al 0.5%, en una proporción de 10 μ l/ml de suspensión, para visualizar mejor la reacción de precipitación (esta suspensión se preparaba 4 horas antes de montar la técnica y se mantuvo en nevera hasta su uso para efectos de estabilización).

Se procedió a preparar diluciones dobles seriadas (1/2 hasta 1/1024) del suero hiperinmune a evaluar, en placas fondo U, manteniendo un volumen constante de 50 μ l., añadiendo 50 μ l del antígeno sensibilizado con la Safranina, manteniendo un volumen final de 100 μ l por pozo. Se incubó a 37° por 18 horas.

LECTURA DE LA PRUEBA:

Se realizó observando el fondo de las microplacas sobre un soporte con un espejo lupa que refleja el fondo de los pozos.

Un fondo que muestra una suspensión homogénea es considerado positivo y un fondo con un botón nítido es considerado negativo.

El título de anticuerpos esta dado por la última dilución donde se observa un fondo homogéneo.

RESULTADOS

- La concentración de C_{60} en los sueros de conejos hiperinfectados con C_{60} fue de 148 mg/dl.
- La concentración de C_{60} en los sueros de conejos hiperinfectados con C_{60} fue de 148 mg/dl.
- La concentración de C_{60} en los sueros de conejos hiperinfectados con C_{60} fue de 148 mg/dl.

Pre-inoculación

Post-inoculación

RESULTADOS

Conejo N° 1 (Sero. A): 148 mg/dl	Conejo N° 1 (Sero. A): 148 mg/dl
Conejo N° 2 (Sero. B): 148 mg/dl	Conejo N° 2 (Sero. B): 148 mg/dl
Conejo N° 3 (Sero. C): 148 mg/dl	Conejo N° 3 (Sero. C): 148 mg/dl
Conejo N° 4 (Sero. D): 148 mg/dl	Conejo N° 4 (Sero. D): 148 mg/dl

- La concentración de C_{60} en los sueros de conejos hiperinfectados con C_{60} fue de 148 mg/dl.
- La concentración de C_{60} en los sueros de conejos hiperinfectados con C_{60} fue de 148 mg/dl.

RESULTADOS

- ♦ Los 4 conejos que sirvieron como modelo experimental para la obtención de los sueros hiperinmunes permanecieron vivos y sin evidencia de enfermedad, no mostrando alteraciones de peso o signos clínicos como irritabilidad, bigotitis o conjuntivitis durante el curso de la investigación.
- ♦ Las cepas de referencia de *C. neoformans* se mantuvieron viables y sin muestra de contaminación.
- ♦ La determinación de Inmunoglobulina G (IgG) en los sueros de conejo mostró los siguientes valores para las etapas de pre y post-inmunización:

Pre-inmunización:

Conejo N° 1(Serot. A): 152 mg/dl
Conejo N° 2(Serot. B): 148 mg/dl
Conejo N° 3(Serot.C): 150 mg/dl
Conejo N° 4(Serot.D): 153 mg/dl

Post-inmunización:

Conejo N° 1(Serot.A): 340 mg/dl
Conejo N° 2(Serot.B): 283 mg/dl
Conejo N° 3(Serot.C): 365 mg/dl
Conejo N° 4(Serot.D): 365 mg/dl

- ♦ La Técnica de aglutinación en placa para la detección de anticuerpos en el suero contra antígeno polisacárido mostró títulos bajos para todos los serotipos: A (1:8), B (1:2), C (1:4) y D (1:4).
- ♦ Los títulos de anticuerpos presentes en los sueros hiperinmunes obtenidos no fueron lo suficientemente elevados para detectar niveles mínimos de antígeno por el método de aglutinación en placa.

DISCUSIÓN

DISCUSION

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación mostraron **títulos bajos para la detección de antígeno por el método de Aglutinación en Placa.**

Son múltiples los factores que pueden haber afectado estos hallazgos, entre ellos se pueden mencionar:

✓ La pobre inmunogenicidad de *C. neoformans* debido a la estructura antigénica de su polisacárido capsular, demostrada por lo difícil que resulta desarrollar una adecuada respuesta de anticuerpos, tanto en el hombre como en los animales inmunizados con el microorganismo.

Además el polisacárido capsular, por la propiedad ya señalada, es capaz de inducir un estado de tolerancia inmunológica, que conlleva a una disminución de la producción de anticuerpos, más que en la neutralización de éstos por el antígeno, además de inducir la producción de células supresoras.

Como muchos polisacáridos son ubicuos en el ambiente la exposición continua del animal a éstos polisacáridos o a *Cryptococcus* saprófitos pueden hacerlo tolerante.

✓ Otro factor implicado pudo ser la alteración de la capacidad de virulencia y patogenicidad de las cepas de referencia utilizadas, las cuales pueden haber sufrido modificaciones debido al tiempo y forma de conservación.

✓ En el esquema de inmunización implementado inferimos que la cantidad (dosis) y número de inoculaciones realizadas pudo no ser la más adecuada para la obtención de una respuesta inmune efectiva en los animales.

El no haber utilizado adyuvantes en nuestro esquema es un factor a tomar en cuenta en la modulación de la respuesta inmune del huésped experimental, incrementando la disponibilidad del antígeno a la célula presentadora de antígeno, prolongando la persistencia del antígeno en los tejidos (por liberación lenta y en forma continua), o estimulando directamente a la célula presentadora de antígeno.

✓ A pesar de que la Aglutinación de Latex se utiliza de rutina en el diagnóstico de *Cryptococcus neoformans* y además ha sido empleada exitosamente en su serotipificación, ya sea mediante anticuerpos policlonales previamente adsorbidos o por anticuerpos monoclonales específicos, nosotros nos propusimos estandarizar la técnica de Aglutinación en Placa para la serotipificación por tratarse de una técnica sencilla, económica, de mayor alcance, ya que no fue posible sensibilizar partículas de latex con sueros hiperinmunes específicos para cada serotipo de *C. neoformans*, por no disponer de ellas, además de ser un método laborioso y costoso. No cumpliendo la técnica ensayada con los resultados esperados probablemente por no ser suficientemente específica para este fin.

Vale la pena considerar que quizás los títulos obtenidos por éste método puedan ser mejor detectados por otra técnica de mayor sensibilidad y especificidad.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones de este estudio demuestran que el uso de los recursos humanos en las organizaciones puede ser optimizado mediante la implementación de estrategias de gestión de talento humano. Estas estrategias deben estar basadas en la identificación de las necesidades de la organización y en la selección de las personas adecuadas para cada puesto. Además, es importante fomentar el desarrollo profesional de los empleados y promover un ambiente de trabajo positivo que fomente la productividad y la creatividad.

CONCLUSIONES

En conclusión, el estudio demuestra que el uso de los recursos humanos en las organizaciones puede ser optimizado mediante la implementación de estrategias de gestión de talento humano. Estas estrategias deben estar basadas en la identificación de las necesidades de la organización y en la selección de las personas adecuadas para cada puesto. Además, es importante fomentar el desarrollo profesional de los empleados y promover un ambiente de trabajo positivo que fomente la productividad y la creatividad.

Por lo tanto, se recomienda a las organizaciones que implementen estas estrategias de gestión de talento humano para optimizar el uso de sus recursos humanos y mejorar su productividad y competitividad. Además, se recomienda a los investigadores que continúen estudiando el tema de la gestión de talento humano en las organizaciones para identificar nuevas estrategias y técnicas que permitan optimizar aún más el uso de los recursos humanos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ♦ Las cepas de los serotipos empleados mostraron deficiencias en sus características patogénicas y en su capacidad antigénica. Vale la pena señalar que estos serotipos utilizados en el estudio fueron de referencia, razón por la cual desconocemos las condiciones en las cuales fueron mantenidas, así como el tiempo de preservación de las mismas. Variables que pueden repercutir directamente sobre el comportamiento, al momento de ser ensayadas
- ♦ Dado los resultados obtenidos, se pudo observar que factores como el número de inoculaciones y la cantidad de inóculo utilizados, pudieron afectar al esquema de inmunización ensayado; de igual manera es posible que la utilización de un adyuvante a la hora de colocar el inóculo, optimizara la respuesta inmune del animal y en consecuencia mejorar la calidad del suero hiperinmune, minimizando el efecto intrínseco del *Cryptococcus neoformans* (baja inmunogenicidad).
- ♦ Realizar ensayos con nuevas técnicas diagnósticas que vayan a la par con el avance tecnológico. A pesar de que la prueba de aglutinación en placa es una técnica en desuso para este tipo de estudios y tomando en cuenta que existen técnicas más avanzadas, se propuso este modelo, para detectar la respuesta humoral en los animales ensayados, además de abaratar costos a la hora de realizar estudios de casuística nacional de los serotipos de *Cryptococcus*

neoformans no existentes en el país y tan importantes para establecer mejores estudios epidemiológicos.

- ◆ Se hace necesario para la implementación de este tipo de investigación contar con mayor disponibilidad de tiempo, recursos económicos, y disponer de una infraestructura adecuada para la buena sobrevivencia y evolución de los animales de experimentación, elementos básicos del estudio.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Argüero L.B., Garza G. D., et al. Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la Ciudad de México. Rev. Iberoam Micol. (1999), 16: 40-42.
- 2.- Balows, A., Hausler, W.J., Hermann, K.L., Iseberg, H.D., Shadomy, H.J., Manual of clinical microbiology. Fifth Edition. 1991.
- 3.- Callejas, A., Ordoñez, N., et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia". Medical Mycology (1998) 36: 341-344.
- 4.- Campins, H., Galavis, D., Vegas, H. Cryptococcosis en Venezuela. (1975), Mycopathología, 55: 153-157.
- 5.- Conant, Smith, Baker, Callaway. Manual of Clinical Mycology. Third Edition. 1971.
- 6.- Cherniack R, Sundstrom JB. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. Minireview Infect. Immunol. (1994). 62(5): 1507- 12.
- 7.- Dromer F, Gueho E, Ronin O, Dupont B. Serotyping of *C. neoformans*. by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. J. Clin. Microbiol. (1993) 31(2): 359-63.

8. Dolan, C. T.; Specificity of the latex Cryptococcal antigen test. Am J. Clin Pathol. (1971). 58. 358-364.
9. Dufait, R; Velho, R; De Vrocy. C; Rapid identification of the tho varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-Propline Asimilation. Mykosen 1997: 30 (10) 483.
- 10.- Evans, E.E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans* I. A serologic classification by means of the capsular and aglutination reactions. J. Immunol (1950) 64: 423-430.
- 11.- Evans E.E., Kessel, J.F. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans* II. Serologic studies whit the capsular polysaccharide. J. Immunol. (1951) 67: 109-114.
- 12.- Hotzel, H., Kielstein, P., et al. Phenotypic and genotypic differentiation of several human and avian isolates of *Cryptococcus neoformans*. (1998). Mycoses 41: 389-396.
13. - Ikeda R, Matsuyama H, Nishikawa A, Shinoda T, Fukazawa Y. Comparison of serological characteristios of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A -D and *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. Microbiol. Immunol 1991; 35 (2): 25-138.
- 14.- Ikeda R.,Shinoda T., et al., Role of Serum Factors in the Phagocytosis of Weakly or Heavily Encapsulated *Cryptococcus neoformans* Strains by Guinea Pig Peripheral Blood Leukocytes. Micobiol Immunol. (1984) 28: (1), 51-61.

- 15.- Ikeda, R., Nishikawa, A., et al. Chemical Characterization of Capsular Polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* Serotype A-D. *Microbiol Immunol* (1985), 29:(10), 981-991.
- 16.- Kaufman, L., Blumer, S., Value and Interpretation of Serological Test for The Diagnosis of Cryptococcosis. *Applied Microbiology* (1968) 16: (12), 1907-1912.
- 17.- Kaufman L., Currents Methods for Serodiagnosing Systemic Fungis Infections and Identifying Their Etiologic Agents. Centers For Diseases Control. "L'igiene Moderna" (1981), LXXVI : (3), 427-442.
- 18.- Kozel TR. Antigenic structure of *C. neoformans* capsular polysaccharide: En Krurstak E., ed. *Immunology of fungal disease*. N.Y. Marcel Dekker, 1989:144-154.
- 19.- Kozel, T., McGaw ,T. Oponsonization of *Cryptococcus neoformans* by Human Immunoglobulin G: Role of IgG in Phagocytosis by Macrophages. *Infection and Immunity* (1979) 25: (1) 255-261.
- 20.- Kozel, T., Cazin, J., Induction of Humoral Antibody Response by Soluble Polisaccharide of *Cryptococcus neoformans*. *Mycophatologia et Mycologia Aplicatta* (1974), 54: (1), 21-30.
- 21.- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I. & Bennett, J.E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotipes B and C). 1982 *J. Clin. Microbiol.* 15: 535-537.

- 22.- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I. & Bennett, J.E. (eds): Cryptococcosis . In: Medical Mycology, Philadelphia: Lea & Febiger, 1992: 397-411.
- 23.- Lazéra, M. S., Pires, F., Camillo –Coura, L., et al. "Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees."(1996). J Med Vet Mycol 34: 127-131.
- 24.- Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z. & Vilgalys, R. Hibridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. 1993. J. Clin. Microbiol. 31: 2274-2280.
- 25.- Mukamurangwa, P., Raes-Wuytack, C., et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can be separated from var. *neoformans* by its ability to assimilate D-tryptophan. (1995). J. Med Vet Mycol 33: 419-420.
- 26.- Nakamura, Y., Kano, R., et al. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromthymol blue medium. (1998). Mycoses 41: 35-40.
- 27.- Perfect, J.R., Wong, B., et al. *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. (1998). Med Mycol 36: (1) 79-86.

- 28.- Reilo, I., Takaho, S., et al. Antigenic Characterization of *Cryptococcus neoformans* Serotypes and Its Application to Serotyping of Clinical Isolates. (1982) J Clin Microbiol 16: (1) 22-29.
- 29.- Rippon, J.W., (1990) Tratado de Micología Médica. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. Mexico.
- 30.- Saiz M.,Laureano, García, J.L., Compaire, C., Animales de Laboratorio cría, manejo y control sanitario. 1983.
- 31.- San Blas, G., The cell wall of fungal pathogens: Its possible role in host- parasite relationships. A review. Mycopathologia (1982) 79, 159-184.
- 32.- Tanner, D.C.; et al. Comparison of comercial kits for detection of Cryptococcal antigen. J. Clin Microbiol. 1994.32 (7): 1680-1684.
- 33.-Thrid International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis.París (France), September 22-26, 1996. J, Mycol. Med., (1997), 7: 55-61.
- 34.- Tortorano,A.M., Viviani, M., et al. Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy. (1997).Mycoses 40: 297-302.

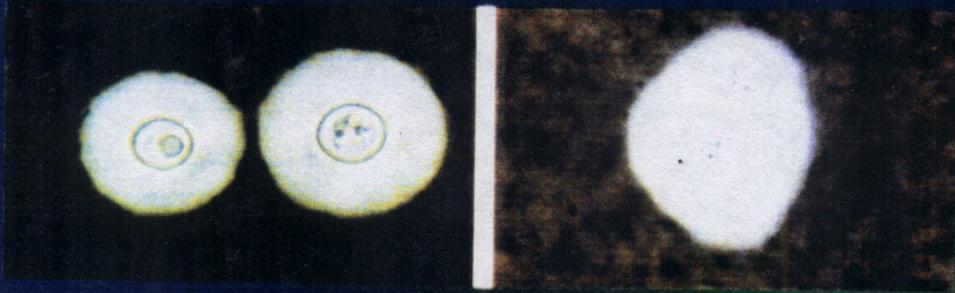
35.- Villanueva, E., Mendoza, M., Torres, E., Albornoz, M.B., et al Serotipificación de 27 cepas de *Cryptococcus neoformans*, aisladas en Venezuela. (1989) Acta Científica Venezolana 40: 151-154.

36-. Viviani, M.A. Wen, H., et al., Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. J. Med Vet Mycol (1997), 35, 355-360.

ANEXOS

ANEXOS

EXAMEN DIRECTO (tinta china)



Examen directo: *C. neoformans*. Tinta china.

var. *neoformans*

var. *gambii*

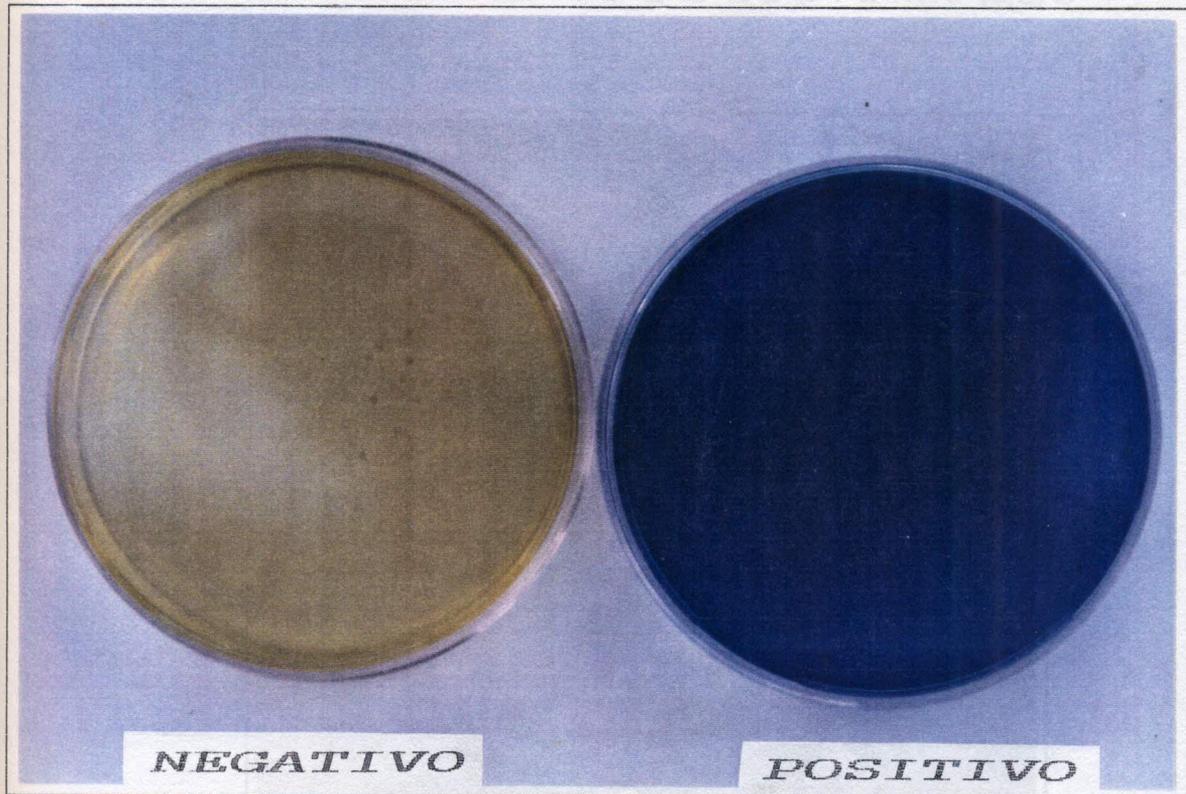


Cultivo en agar. *C. neoformans*

Viraje de color a las 24 horas

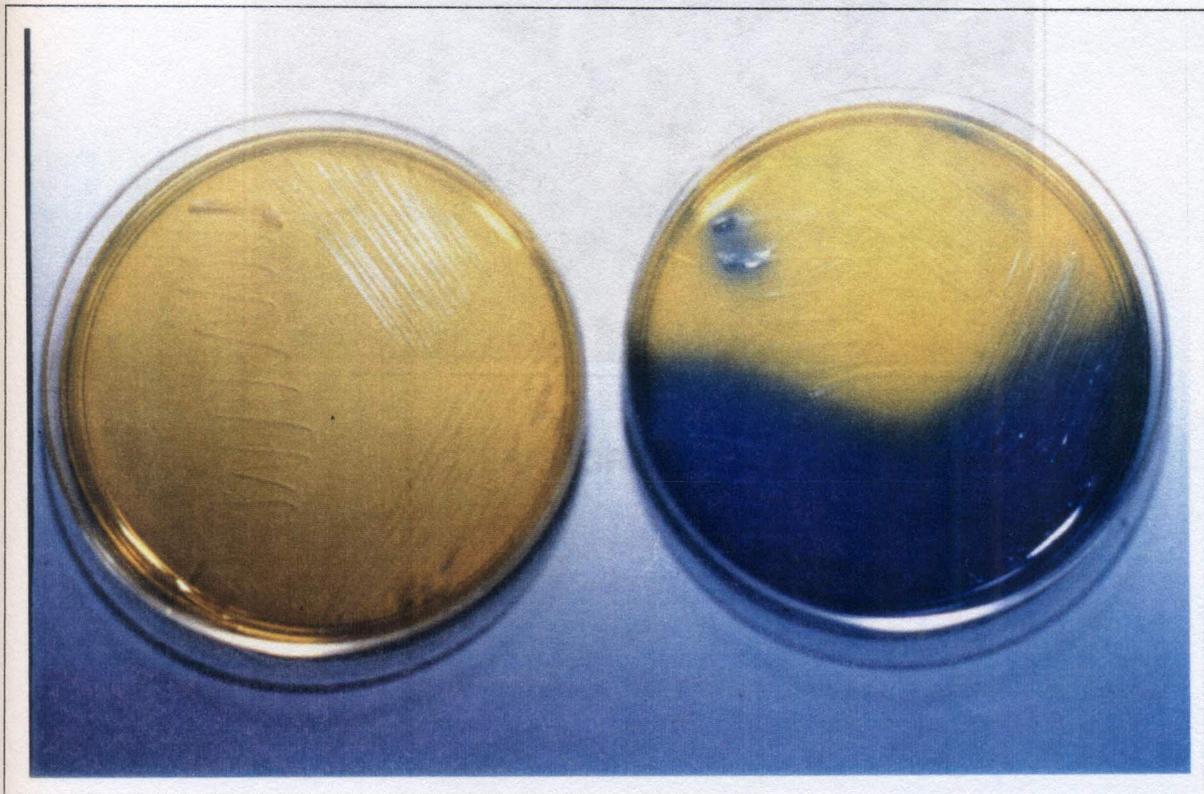
MEDIOS CROMOGÉNICOS

MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES



var. *neoformans*

var. *gattii*



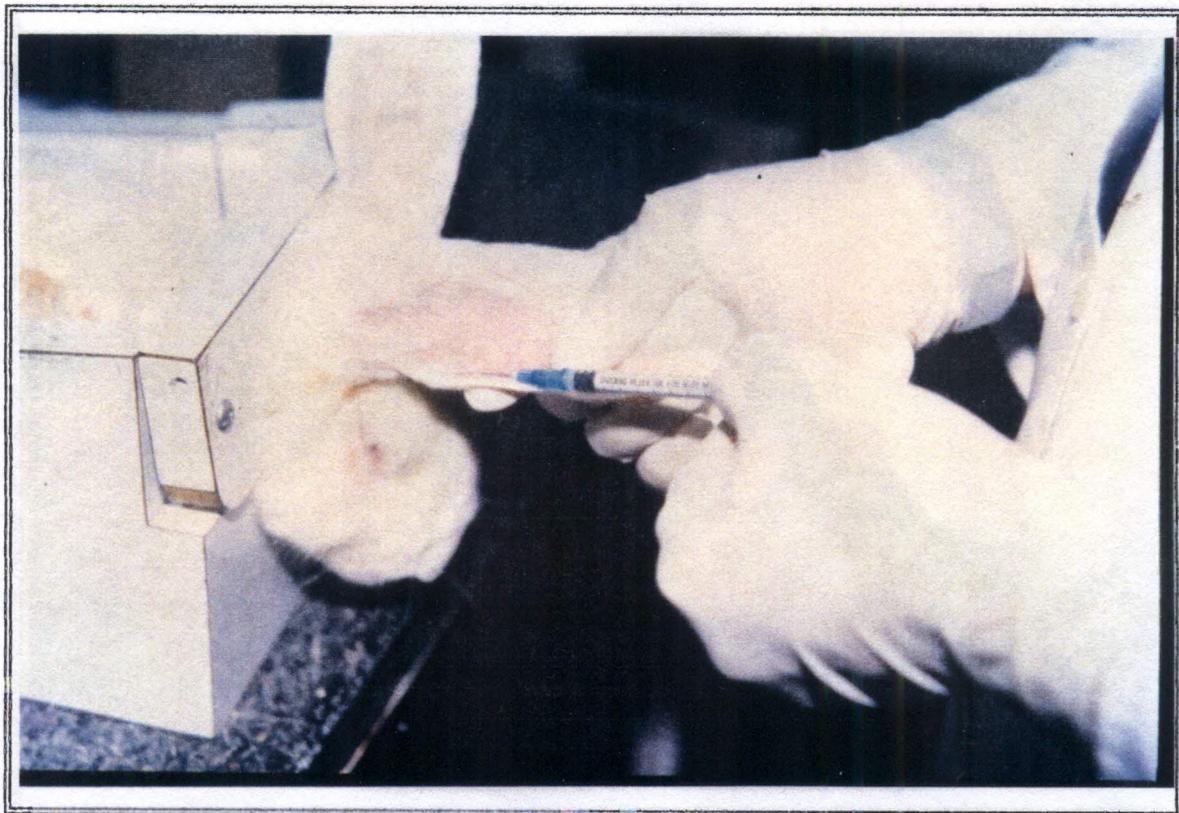
Viraje de color a las 24 horas

MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES



BIOTERIO "GRANJA LA TORCAZ"

TECNICA DE AGLUTINACION EN PLACA

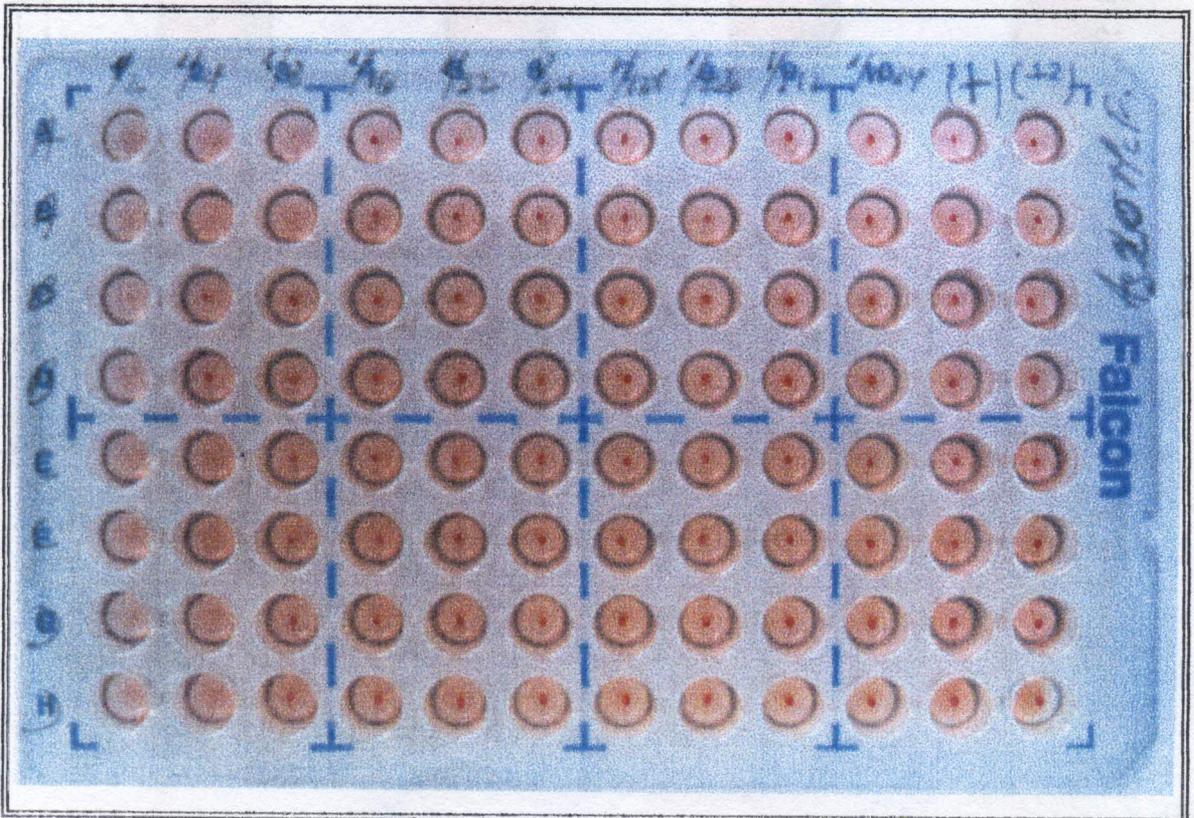
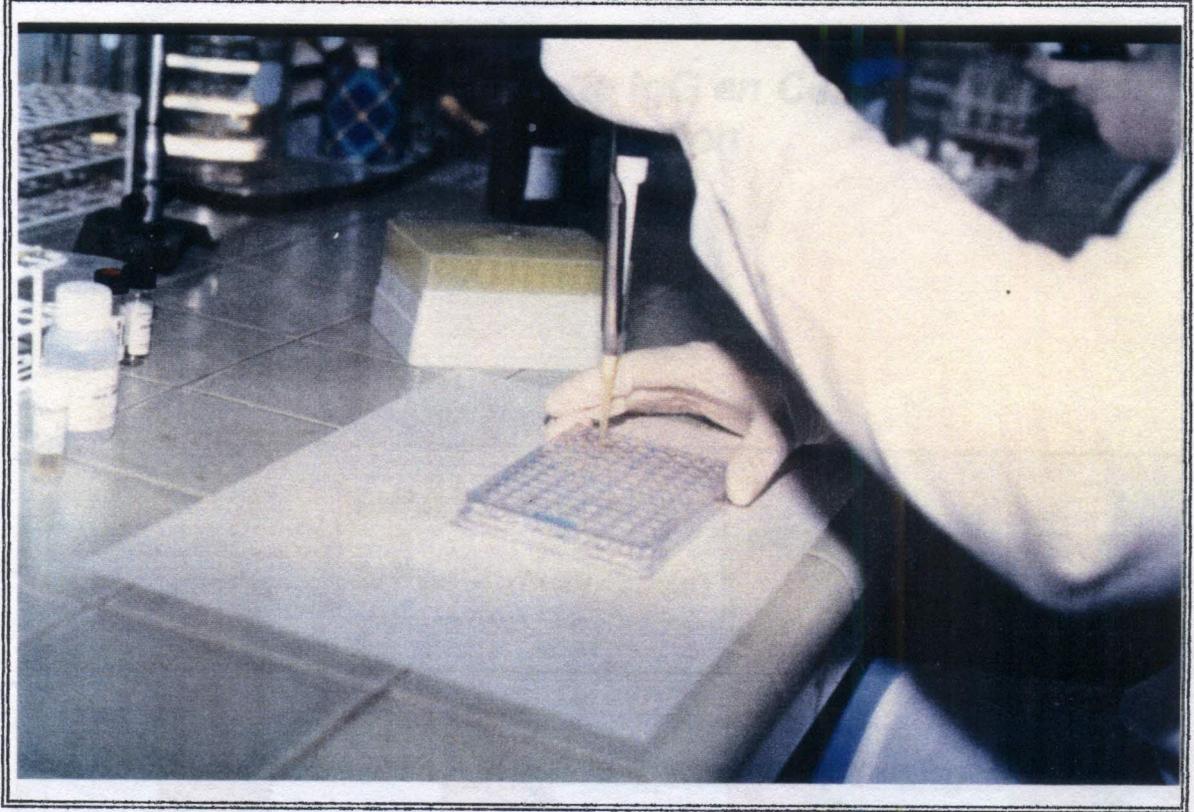


Inoculación via vena marginal de la oreja



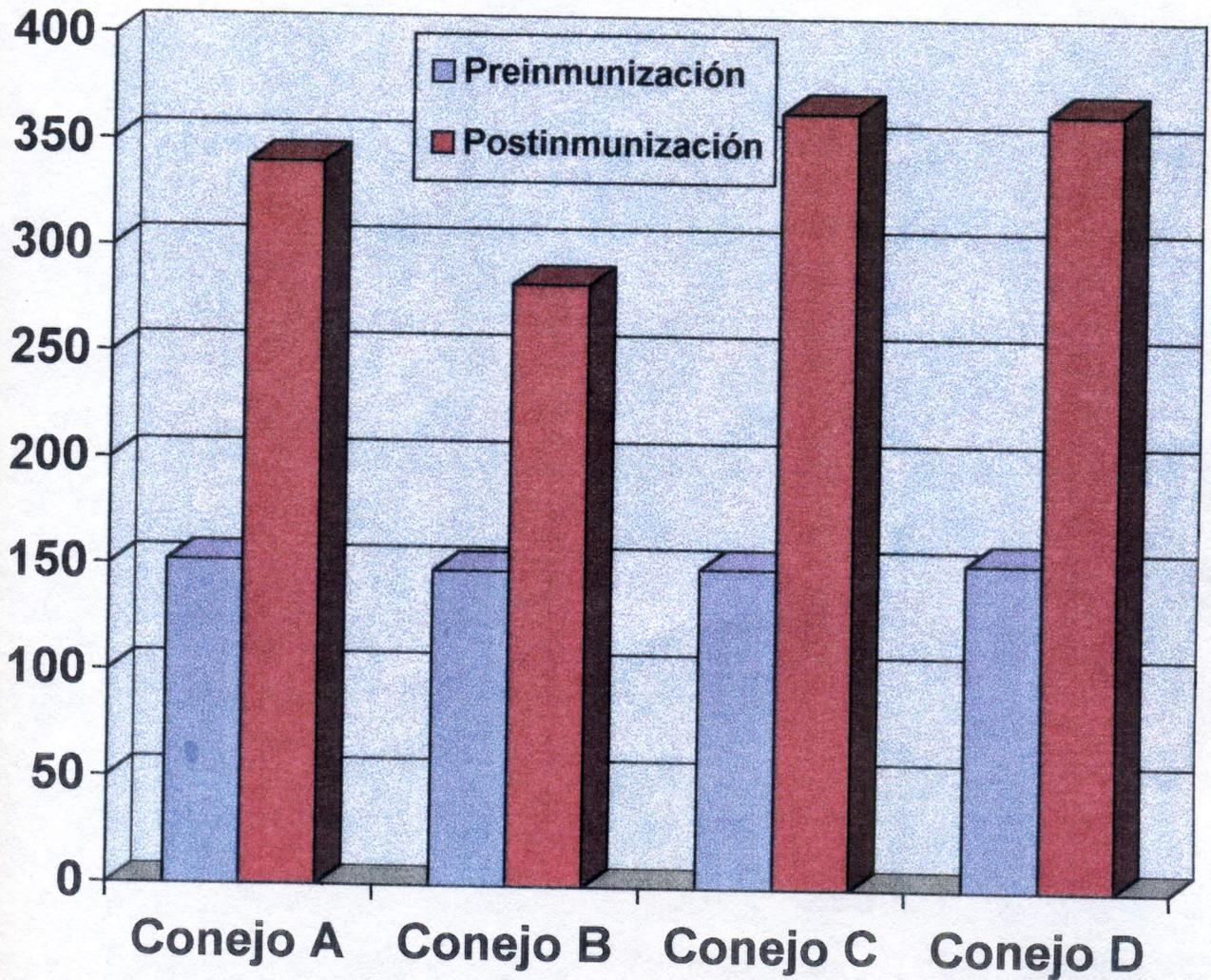
Sangrado post inmunización.

TECNICA DE AGLUTINACION EN PLACA



Comparación de Niveles de IgG en Conejos Pre y Postinmunización

mg/dl



INSTITUTO NACIONAL
DE HIGIENE
BIBLIOTECA
N.º 2.571