

# DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CRIPTOCOCOSIS EN MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO MEDIANTE LA PCR-ELISA

Abel Tinoco<sup>1</sup>, José Arellano<sup>2</sup>, Rima Gharaibeh<sup>1</sup>, Eugenio Vazquez<sup>2</sup>, Alejandro Bonifaz T<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA)-IPN, <sup>2</sup>Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, <sup>3</sup>Hospital General de México.

CICATA-IPN, Legaria 694, Col. Irrigación, México D.F., C.P. 11500. fax: 53954147, [r\\_gharaibeh@hotmail.com](mailto:r_gharaibeh@hotmail.com)

Palabras clave: Criptococosis, *Cryptococcus neoformans*, PCR-ELISA

**Introducción.** La criptococosis es una micosis causada por el hongo oportunista *Cryptococcus neoformans*, se presenta frecuentemente como una infección del sistema nervioso central (SNC), y es importante en las personas inmunosuprimidas, especialmente en los pacientes con SIDA. Los métodos del diagnóstico molecular permiten la detección temprana y específica de la infección. Debido a la importancia de las micosis en los pacientes inmunosuprimidos, es vital contar con estrategias para el diagnóstico clínico rápido de micosis como primer paso, seguido por la identificación del hongo infeccioso. Los protocolos que cumplen con este criterio están básicamente basados en la PCR seguida por la hibridación del amplicon, sobre una membrana, con sondas específicas para cada hongo (1-3). Dos de estos protocolos cuenta con sondas para *C. neoformans*, sin embargo, ninguna fue adecuadamente evaluada en muestras de líquido cefalorraquídeo “LCR”.

El objetivo general de este trabajo es la evaluación de una sonda específica derivada del gen ribosomal 28S (3), para detectar cantidades mínimas de *C. neoformans* en muestras de LCR, aplicando la tecnología de PCR-ELISA (4), ya que es más sencilla y rápida que las hibridaciones sobre membranas.

**Metodología.** El DNA total de los cultivos puros de hongos, así como del LCR fue extraído usando el kit “QIAmp tissue” (Qiagen), con algunas modificaciones. La reacción de PCR con los primers universales de hongos (1) fue optimizada, en presencia de digoxigenina-dUTP (Roche, Mannheim) para obtener productos de PCR marcados con DIG. Los ensayos PCR-ELISA se realizaron con la sonda de *C. neoformans* (3) marcada con biotina en el extremo 5', y aplicando el “DIG-detection kit”(Roche).

**Resultados y discusión.** La sensibilidad de la PCR para detectar DNA de *C. neoformans* variedades *neoformans* y *gattii* fue de 200 pg y 2 ng, respectivamente. Los resultados del ensayo PCR-ELISA optimizado, mostraron una detección específica del DNA de *C. neoformans*, con una sensibilidad de 20 y 2 ng de DNA de las variedades *neoformans* y *gattii*, respectivamente (fig. 1). Además, el ensayo fue probado exitoso para diagnosticar criptococosis en LCR, utilizando muestras de pacientes previamente diagnosticadas por métodos convencionales y otras infectadas *in vitro*. El LCR no infectado o infectado con otros patógenos resultó negativo.

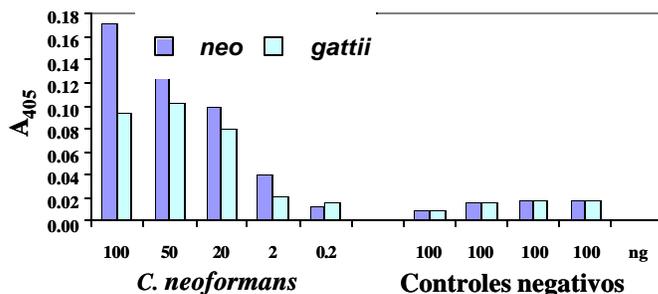


Fig 1. Ensayo PCR-ELISA para detectar DNA de *C. neoformans* variedades: *neoformans* y *gattii*.

**Conclusiones.** La optimización de la PCR empleada nos permitió obtener resultados más reproducibles, con cantidades pequeñas de hasta 200 pg de DNA de *Cryptococcus*. Las modificaciones que realizamos para aplicar los primers y sonda previamente diseñados (1,3), en el ensayo PCR-ELISA son importantes porque la estrategia además de ser específica, es más rápida que la PCR seguida por hibridación sobre membranas de transferencia, lo que permite diagnósticos más oportunos. Además, se puede automatizar para procesar un gran número de muestras clínicas.

**Agradecimiento.** El trabajo fue parcialmente financiado por la fundación Kindercancer. México.

## Bibliografía.

- Sandhu, GS, Kline, BC, Stockman, L, y Roberts, GD. (1995). Molecular probes of fungal infections. *J Clin Microbiol.* 33(11): 2913-2919.
- Posteraro, B, Sanguinetti, M, Masucci, L, Romano, L, Morace, G y Giovanni F. (2000). Reverse cross blot hybridization assay for rapid detection of PCR-amplified DNA from *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Saccharomyces cerevisiae* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 38(4): 1609-1614.
- Evertsson, U, Monstein, HJ y Johansson, AG. (2000). Detection and identification of fungi in blood using broad-range 28S rDNA PCR amplification and species specific hybridisation. *APMIS.* 108: 385-392.
- Löffler, J, Hebart, H, Sepe, S, Schumacher, U, Klingebiel, T y Einsele, H. (1998). Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Med Mycology.* 36: 275-279.