

**RECUPERACIÓN DE *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* EN
ESPECIES VEGETALES ARBÓREAS EN EL PERÍMETRO URBANO DE SEIS
CABECERAS MUNICIPALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.**

NUBIA EDITH ENRIQUEZ GUERRERO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2015**

**RECUPERACIÓN DE *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* EN
ESPECIES VEGETALES ARBÓREAS EN EL PERÍMETRO URBANO DE SEIS
CABECERAS MUNICIPALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.**

NUBIA EDITH ENRIQUEZ GUERRERO

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Directora:

M.Sc. FABIOLA GONZALEZ CUELLAR

Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología

CEMPA

Codirector:

M.Sc. LUIS REINEL VASQUEZ A.

Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología

CEMPA

Asesora:

M.Sc. PATRICIA ESCANDON

Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud

INS

Colciencias 21045431629

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

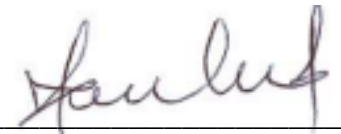
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2015

Nota de Aceptación



Norida Vélez Cuellar
Jurado

Geovanni Varona
Jurado

Fabiola González
Directora

Popayán, 10 de Septiembre del 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios por regalarme un día más de vida y así poder culminar una de mis etapas.

A mi familia, por su apoyo incondicional, constancia y ejemplo de vida.

A mi directora Fabiola González por darme la oportunidad de formar parte de éste proyecto y depositar su confianza en mí para el desarrollo del mismo.

A mi codirector Reinel Vásquez por brindarme asesoría y conocimientos en el proceso y realización de éste trabajo, además de sus consejos para la vida profesional y cotidiana.

Al grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, especialmente a Patricia Escandón por brindarme su asesoría y amplios conocimientos en esta área de investigación que fueron fundamentales para la ejecución de este trabajo y a quien le quedo muy agradecida.

A mis amigos (as) por estar a mi lado sin importar las circunstancias y brindarme su verdadera amistad.

A mis profesores y compañeros por compartir sus conocimientos durante la formación y carrera profesional.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| 2. ANTECEDENTES | 15 |
| 2.1. EN EL MUNDO..... | 15 |
| 2.2. LATINOAMERICA | 17 |
| 2.3 COLOMBIA | 18 |
| 3. MARCO TEORICO..... | 23 |
| 3.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE <i>Cryptococcus</i> | 23 |
| 3.2. FACTORES DE PATOGENICIDAD..... | 24 |
| 3.2.1. Cápsula..... | 24 |
| 3.3. ENZIMAS EXTRACELULARES..... | 24 |
| 3.3.2 Fenoloxidasa | 24 |
| 3.3.3 Proteasas..... | 25 |
| 3.3.4 Fosfolipasas..... | 25 |
| 3.4. CICLO BIOLÓGICO DE <i>C. neoformans</i> y <i>C.gattii</i> | 25 |
| 3.5. MODO DE INFECCIÓN | 27 |
| 3.6. VARIEDAD Y CARACTERIZACIÓN MOLÉCULAR..... | 28 |
| 3.7. ECOLÓGIA..... | 29 |
| 3.8. EPIDEMIOLOGIA CLINICA | 30 |
| 3.9. ESPECIES DE ÁRBOLES..... | 33 |
| 3.9.1. <i>Calliandra</i> | 33 |

| | |
|---|----|
| 3.9.2. <i>Tabebuia</i> sp..... | 33 |
| 3.9.3. <i>Mangifera indica</i> | 34 |
| 3.9.4. <i>Eucalyptus</i> sp..... | 34 |
| 3.9.5. <i>Terminalia catappa</i> | 34 |
| 3.9.6. <i>Ficus benjamina</i> | 35 |
| 3.9.7. <i>Cassia fistula</i> | 35 |
| 3.9.8. <i>Spathodea campanulata</i> | 35 |
| 3.9.9. <i>Ochroma pyramidale</i> | 36 |
| 3.9.9.1. <i>Cananga odorata</i> | 36 |
| 4. OBJETIVOS | 37 |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL..... | 37 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 37 |
| 5. METODOLOGIA | 38 |
| 5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO | 38 |
| 5.2. ÁREAS DE ESTUDIOS | 38 |
| 5.4. DATOS ECOLÓGICOS. | 40 |
| 5.5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS..... | 40 |
| 5.6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS | 40 |
| 5.7. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA..... | 41 |
| 5.8. CARACTERIZACIÓN MOLÉCULAR | 41 |
| 5.8.1. Extracción de ADN..... | 42 |
| 5.8.2. RFLP del gen <i>URA</i> ₅ | 43 |
| 5.8.3. PCR huella digital (<i>GTG</i>) ₅ | 44 |

| | |
|---|----|
| 5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 45 |
| 6. RESULTADOS..... | 46 |
| 6.1. MUESTRAS AMBIENTALES..... | 46 |
| 6.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA..... | 46 |
| 6.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR..... | 47 |
| 6.4. CONDICIONES AMBIENTALES DE LAS CABECERAS MUNICIPALES ... | 49 |
| 6.5. CONDICIONES AMBIENTALES DE BORDO Y COCONUCO..... | 49 |
| 7. DISCUSION..... | 51 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 56 |
| 9. RECOMENDACIONES..... | 57 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 58 |
| ANEXOS..... | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1: Ciclo biológico de <i>C.neoformans</i> y <i>C.gattii</i> | 27 |
| Figura 2: Mecanismo de infección de <i>Cryptococcus</i> | 28 |
| Figura 3: Ubicación geográfica de las cabeceras municipales | 40 |
| Figura 4: Evaluación de producción de la enzima ureasa y CGB | 48 |
| Figura 5: Caracterización de aislamientos por RFLP- URA5 | 49 |
| Figura 6: Caracterización aislamientos por PCR huella digital - (GTG) ₅ | 49 |
| Figura 7: Variables ambientales Bordo | 51 |
| Figura 8: Variables ambientales Coconuco | 51 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1: Caracterización física de las cabeceras municipales | 40 |
| Tabla 2: Condiciones amplificación, RFLP del gen URA5..... | 44 |
| Tabla 3: Condiciones de amplificación, PCR huella digital (GTG) ₅ | 45 |
| Tabla 4: Muestras positivas de Bordo y Coconuco | 47 |
| Tabla 5: Descripción de factores ambientales | 50 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|------|
| Anexo A: Controles de RFLP del gen URA5..... | 70 |
| Anexo B: Amplificación del gen URA5 de <i>C.neoformans</i> | 70 |
| Anexo C: Sitios de recuperación de <i>C.neoformans</i> en Bordo y Coconuco | 71 |
| Anexo D: Pisos térmicos según Método de Caldas | 71 |
| Anexo E: Lugares muestreados en Bordo | 72 |
| Anexo F: Lugares muestreados en Santander de Quilichao..... | 72 |
| Anexo G: Lugares muestreados en Coconuco | 73 |
| Anexo H: Lugares muestreados en Silvia | 73 |
| Anexo I: Lugares muestreados en Cajibío | 74 |
| Anexo J: Lugares muestreados en de Tímbo | 74 |
| Anexo K: Inventario especies de árboles | 75 |
| Anexo L: Código aislamientos ambientales de <i>C.neoformans</i> | 76 |

RESUMEN

La criptococosis es una micosis patógena, oportunista, causada por las especies *C.neoformans*/*C. gattii*, convirtiéndose en problemática de salud pública mundial debido a los efectos originados como lesiones cutáneas, sistémicas y especialmente lesiones en el sistema nervioso central en pacientes inmunosuprimidos e inmunocompetentes representando un riesgo para su salud.

El objetivo principal del presente estudio fue establecer la presencia de *C.neoformans*/*C. gattii* en especies vegetales arbóreas en el perímetro urbano de seis cabeceras municipales del departamento del Cauca. Se recolectó un total de 1214 muestras vegetales de varias especies de árboles provenientes de Bordo, Cajibío, Coconuco, Tímbio, Santander de Quilichao y Silvia; en los meses de Julio, Agosto, Noviembre de 2013 y Enero-Abril del 2014, 17 muestras fueron positivas para *C.neoformans* recuperado únicamente en Bordo y Coconuco, en especies como *Eucalyptus grandis*, *Terminalia catappa* y *Pinus sp.*

Los aislamientos recuperados se caracterizaron por fenoloxidasa, ureasa, CGB; el patrón molecular se determinó por RFLP del gen URA5 y PCR huella digital usando el iniciador (GTG)₅, identificando la *var.grubii*, serotipo A (VNI).

Las condiciones ambientales como la humedad relativa y temperatura son influyentes en el crecimiento y desarrollo del hongo, pero especialmente en los meses que presentan altas lluvias en donde se logró recuperar la levadura en mayor proporción con respecto a la época.

INTRODUCCIÓN

Actualmente el género *Cryptococcus* constituye alrededor de 38 especies (Rosario et al., 2008), de las cuales *C.neoformans/ C.gattii* se asocian con mayor frecuencia a infecciones humanas siendo agentes causales de morbilidad y mortalidad en pacientes con VIH/SIDA e inmunosuprimidos (Illnait Zaragoza, 2012). La infección es adquirida por inhalación de propágulos infectantes encontrados en el medio ambiente y cuyo tamaño promedio oscila en 2 µm alcanzando los alveolos pulmonares para diseminarse por vía hematológica, especialmente al sistema nervioso central (Tello et al., 2013).

Las especies *C.neoformans/ C. gattii* según sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas se clasifican como *C.neoformans var.grubii* serotipo A, *C. neoformans var. neoformans* serotipo D, el híbrido con serotipo AD y *C.gattii* serotipos B y C (Kwon-Chung et al., 1978), aunque hoy en día se presentan distintos híbridos interespecies como AB (Bovers et al., 2008) y BD (Bovers et al., 2006).

La var. *grubii* se distribuye a nivel mundial, es decir cosmopolita con predilección a suelos contaminados por excretas de aves pero también asociada a distintas especies de árboles, así mismo esta variedad y la de *neoformans* se encuentran particularmente en excrementos de paloma urbana (*Columbia livia*); por el contrario *C.gattii* se halla en detritos de árboles, inicialmente estaba restringida a regiones tropicales y subtropicales, sin embargo aislamientos encontrados en la Isla de Vancouver (Canadá) demostró la habilidad para establecerse en regiones templadas (Kidd et al., 2004).

El conocimiento de la ecología de las especies *C.neoformans/ C.gattii*, así como la genética, la epidemiología, y patogenia de la micosis causada por este hongo, seguirá siendo un reto y un elemento esencial para el proceso de estrategias en manejo y prevención de la infección en los individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes. Por ello se están aplicando diversos métodos de tipificación molecular con los cuales se han obtenido resultados convergentes (Illnait Zaragoza, 2012).

Actualmente, las técnicas moléculares más utilizadas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) específica para la determinar los serotipos y tipos de apareamiento, el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, siglas en inglés), PCR- huella digital, la amplificación al azar mediante reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico (RAPD-PCR, siglas en inglés) y el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Meyer et al., 2003).

Debido a los escasos estudios sobre la eco-epidemiología de la criptococcosis, además del riesgo que puede causar en la salud de los pacientes inmunosuprimidos e inmunocompetentes, se realizó un estudio en la búsqueda de *C. neoformans/ C.gattii* en árboles encontrados en el perímetro urbano de las cabeceras municipales de Bordo, Cajíbio, Coconuco, Santander de Quilichao, Silvia y Tímbio.

1. JUSTIFICACIÓN

La exposición a basidiosporas de las especies *C.neoformans*/ *C.gattii* en el ambiente, su capacidad para crecer y mantenerse a temperatura corporal (36-37°C) (Quintero et al., 2005) como la del ser humano y mamíferos, ocasiona una micosis patógena, oportunista llamada criptococosis afectando principalmente a pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos, representando un riesgo para su salud, inclusive provocar la muerte (Cabral Passoni, 1999).

En el departamento del Cauca, el laboratorio de micología de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca en el año 2007 reportó un caso positivo de *C.gattii* para la cabecera municipal de Bordo, posteriormente el reporte del laboratorio de la secretaria departamental de salud del Cauca para el 2013 dio a conocer un caso clínico de criptococosis de un paciente que provenía del municipio de Cajibío, clasificado como *C.neoformans* var.*grubii* (Comunicación personal con Fabiola González y María Eliza Vernaza).

Es importante la búsqueda ambiental del hongo en el departamento del Cauca no solo por los casos clínicos de criptococosis que se han reportado sino también por el desconocimiento de su estado actual en el ambiente. Por otra parte, éste es el primer estudio ambiental de *C.neoformans*/*C.gattii*, en el cual se tuvieron los factores ambientales como la humedad relativa y temperatura de los sitios estudiados, contribuyendo así en el campo de la investigación.

Este estudio hace parte de un macroproyecto nacional llamado “Predicción de las posibles áreas endémicas para *C. neoformans* /*C.gattii* en Colombia: modelo ecológico de áreas en riesgo” financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología “Francisco José de caldas” (Colciencias) y ejecutado por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

2. ANTECEDENTES

2.1. EN EL MUNDO

El primer aislamiento de *C.neoformans* fue reportado por Sanfelice en 1894, quien lo aisló de un jugo de melocotón fermentado y lo clasificó como *Saccharomyces neoformans* al mismo tiempo reveló que causaba lesiones cerebrales inoculando la levadura en animales experimentales (Sanfelice, 1894). Para el mismo año, dos científicos alemanes, el patólogo Busse (1894) y el dermatólogo Buschke (1895) observaron y aislaron la hongo de una lesión sarcomatosa de un paciente con enfermedad diseminada, el hongo fue llamado *Saccharomyces hominis*.

En 1901 Jean Paul Vuillemin examinó la levadura y observó que este no presentaba características específicas del género *Saccharomyces*, clasificando el hongo dentro del género *Cryptococcus*. En 1935 Rhoda Benham describió los serotipos, morfología y taxonomía de varias cepas de levadura, concluyendo que los aislamientos del hongo encontrados en humanos pertenecieron a una misma especie y planteó conservar el nombre *C. neoformans* propuesto por Vuillemin (Benham, 1935).

En 1950 Evans logró hallar diferencias antigénicas del mucopolisacárido capsular lo cual permitió identificar los serotipos en A, B y C (Evans, 1950). Años más tarde se identificó el serotipo D por Wilson, Bennett y Bailey (Baró, 2002). En 1951 Emmons, por primera vez aisló *C.neoformans* del medio ambiente a partir de tierra, de excremento de palomas y nidos (Emmons, 1951).

Para el año de 1970 el médico F. Gattii consiguió aislar la levadura del líquido cefalorraquídeo de un niño de 7 años que padecía diplopía (visión doble de un

mismo objeto), papiledema y una considerable reducción de la agudeza visual detectándole meningitis (Gattii, 1970), Vanbreuseghem propuso el nombre de *C.gattii* puesto que la levadura tenía diferentes caracteres de *C.neoformans*, siendo aceptada a partir del 2002 (Alvarado, 2008; Baró, 2002).

Kwon-Chung en 1975 contribuyó de manera significativa a la clasificación actual de *C.neoformans*, al describir la reproducción sexual cruzando cepas compatibles α y α produciendo basidiomicetos teleomorfos clasificándolos en *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora* (Kwon-Chung, 1975)

Los estudios ecológicos de *Cryptococcus* iniciaron con la investigación de Emmons y posteriormente en 1989 con Ellis y Pfeiffer, quienes lograron aislar e identificar *C.gattii* en especies arbóreas como *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis* en Australia (Ellis and Pfeiffer, 1990).

El brote de criptococosis atribuido a la especie *C. gattii* en clima templado de la Isla de Vancouver, BC, Canadá, y una investigación realizada entre octubre de 2001 y junio de 2002, se recolectaron 732 muestras ambientales de 347 árboles distintos, como eucaliptos (*Eucalyptus* spp.), madroño (*Arbutus menziesii*), aliso (*Alinus* spp.), Cedro (*Cedrus* spp.), abeto de Douglas (*Pseudotsuga* spp.), y otros; las muestras ambientales se analizaron por PCR-huella digital y análisis de AFLP. La mayoría de las muestras pertenecieron al tipo molecular VGII / AFLP6. Se observaron dos o tres subtipos dentro de VGII (VGIIa-VGIIb)/ FLP6 tanto en aislamientos clínicos como del medio ambiente. Todos los aislamientos eran tipo de apareamiento α . La incidencia de infección de los habitantes de la isla en los años de 1999-2003 fue de 8,5 y 37 casos por millón de habitantes por año. Esta incidencia es significativamente mayor que la infección de *C. gattii* típicamente observada en Australia (0,94 casos por millón de habitantes por año). La aparición de este patógeno en la isla de Vancouver destaca la distribución cambiante de

este genotipo, por ello la importancia de un esfuerzo de colaboración permanente en la vigilancia de la epidemiología global de esta levadura (Kidd, 2004).

Posteriormente un muestreo ambiental realizado entre octubre de 2001 y diciembre de 2005 en la parte continental de la Columbia Británica, las Islas del Golfo, y Washington mostró que 60 (3%) de 2.033 muestras ambientales (aire, agua, suelo, hisopos de árboles y otras estructuras) fueron positivos para *C. gattii* serotipo B (58 VGIIa, 2 VGI) (Datta et al., 2009).

(Nawange et al., 2006) Realizó un estudio en la ciudad de Jabalpur (India Central) en el cual reportó *C.gattii* (serotipo B) y *C.neoformans* var.*grubii* (serotipo A) en detritos de especies como *Tamarindus indica*, *Mangifera indica* y *Syzygium cumini* encontrados en oquedades de dichos árboles, nunca co-produjeron las dos especies en un mismo nicho.

Las investigaciones en torno a los más diversos aspectos relacionados con este agente y la enfermedad que produce, dieron lugar a su clasificación actual pero que aún se considera una especie compleja.

2.2. LATINOAMERICA

En la República de Panamá un estudio realizado por Rivas et al, recolectaron 25 muestras de suelo de las cuales aislaron 2 cepas pertenecientes a la variedad *neoformans*. Inicialmente no presentaban cápsula, pero al inocularlas intracerebralmente en ratones suizos recién nacidos, la desarrollaron. Esto tiene implicaciones para el hombre y otros animales, porque las cepas sin cápsula provenientes de la naturaleza pueden desarrollarlas una vez establecidas en el hospedero (Rivas et al., 1999).

En el Estado Brasileño, Rio Grande, recuperaron *C. neoformans* var.*grubii* y var.*neoformans* en excretas de paloma y *C.gattii* en *Eucalyptus spp* identificado como VGIII (Casali et al., 2003).

Las muestras de fuentes ambientales en Brasil específicamente en las oquedades de árboles ubicados a lo largo de un sendero en la selva amazónica como *Cassia*, *Ficus*, *Moquillea* y en detritos de *Eucalyptus camaldulensis* pertenecieron a los serotipos A y B, lo que demuestra su ocurrencia en ambientes silvestres (Nishikawa et al., 2003).

En la Ciudad de Buenos Aires (Argentina) se recolectaron 489 muestras de las oquedades o fisuras de los árboles en siete parques diferentes, recuperando 8 muestras de *Tipuana tipu*, *Eucalyptus spp.*, *Phoenix sp.*, pertenecientes *C. neoformans*, serotipo A y genotipo VNI. De la especie *C. gattii* se recuperaron 18 aislamientos de *Tipuana tipu*, *Eucalyptus sp.*, *Acacia visco*, *Cupressus sempervirens* y *Ulmus campestris*, los aislamientos fueron serotipo B y genotipo VGI (Refojo et al, 2009).

Asi mismo se han tenido reportes de *C.neoformans* y/o *C.gattii* en países como México (Olivares et al., 2009), Perú (Canelo et al., 1999), Venezuela y Chile (Calvo et al., 2001).

2.3. COLOMBIA

En Santafé de Bogotá se realizó un estudio de asociación del genero *Criptococcus* con especies de *Eucalyptus*, las muestras se recolectaron en agosto y noviembre de 1992, la temperatura y humedad promedio de recolección fue de 16.42°C y

62.5% respectivamente, se recuperó dos aislamientos de la *var.neoformans* a partir de detritos, estos datos iniciales fueron importantes como primera evaluación del hallazgo de *Criptomococcus* en Colombia (Duarte et al., 1994).

Entre los años de 1996- 1997 en la ciudad de Cúcuta (Norte de Santander) un estudio determinó la presencia de *C.gattii* (serotipo C) a partir de dos árboles de almendro (*Terminalia catappa*), primer reporte para Colombia de esta especie (Callejas et al., 1998). Siguiendo la misma línea de trabajo (Castañeda et al., 2001) realizó un estudio sobre la persistencia del hongo en los dos almendros previamente reportados en diferentes épocas del año, recolectaron muestras de detritos, hojas y semillas entre mayo de 1997 hasta julio de 1998, adicionalmente se registró las variables ambientales. *C.gattii* (serotipo C) se aisló de 31 muestras positivas (19.3%) de las 160 muestras colectadas hallándose únicamente en detritos. El promedio de temperatura durante los 26 meses de estudio fue entre 27.8 y 28.8°C, y el porcentaje de humedad relativa entre 66 y 72% sin que se presentaran cambios importantes en estos dos parámetros, la precipitación anual vario de 595 mm en 1997, 811.2 mm en 1998 y 1341.1 en 1999.

En Bogotá se realizó una investigación durante un periodo de 5 meses entre enero y mayo del 2003, recolectando un total de 480 muestras de árboles del Jardín Botánico, Parque Metropolitano y campus de la Universidad Nacional, de las cuales se aislaron 98 cepas; 97 (99%) correspondieron a *C.gattii*, serotipo B halladas en corteza y suelo, en su mayoría se aislaron en temporada de lluvia (Abril y Mayo) presentando una humedad relativa de 85% y temperatura promedio de 14°C, el 1% fue *C.neoformans*, serotipo A, encontrado en corteza en temporada seca (enero) y con humedad relativa de 67%; todas las levaduras se aislaron a partir de *Eucalyptus camaldulensis* (Castañeda, 2001).

En el municipio la Calera (Cundinamarca) en el año 2003 se realizó un muestreo en detritos de eucaliptos (*Eucalyptus spp.*) entre febrero y marzo, temperatura promedio fue de 12.8 y 13.1°C éste estudio se destacó por ser el primer informe del aislamiento de la especie *C. gattii* (serotipo B) en Colombia (Escandón et al., 2005).

(Quintero et al., 2005) Estudió la distribución ambiental de *C. neoformans* en diferentes pisos térmicos en dos áreas ubicadas en el departamento de Cundinamarca. Exploró tres tipos de reservorios y de las 765 muestras procesadas, 146 correspondieron a excretas de paloma (*Columba livia*), 437 a detritos de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*) y 182 detritos de almendros (*Terminalia catappa*), como resultado *C. neoformans* estuvo presente en 12 (46%) de los 26 municipios estudiados, en los dos transectos; 31 (30%) muestras positivas para excretas de paloma pertenecientes al serotipo A, 70 positivas para eucaliptos de las cuales 1(1%) fue de serotipo A, 62 (59%) de serotipo B y 7 (7%) de serotipo C y en almendros 3 (3%) positivas de serotipo C, evidenciando la preferencia de *C. neoformans* por el piso térmico frío ubicado de 2000 a 3000 m.s.n.m con temperaturas entre 12°C y 18°C, igualmente se determinó la presencia del serotipo A en los pisos térmicos cálido con temperatura superior a 24°C o igual, extendiéndose altitudinalmente desde los 300 hasta los 1000 m, templado con rangos de alturas entre 1000 a 2000 m.s.n.m y temperaturas entre 18°C y 24°C y frío. El serotipo B se aisló del piso térmico frío y serotipo C se aisló de las zona cálida y fría. Este estudio logró recuperar los serotipos A, B y C de muestras de eucalipto.

En el año 2006 el grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud realizó un estudio retrospectivo desde el año 1994 hasta el 2004 compilando datos sobre las cepas ambientales aisladas de muestras de árboles en Cali, Bogotá, Medellín y Cúcuta durante un período de 12 años igualmente tuvieron cuenta los reportes

climatológicos de cada una. La mayoría de las muestras fueron tomadas de árboles de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), seguido de bragance (*Licania tomentosa*) y almendros tropical (*Terminalia cattapa*). Se tomaron 8.220 muestras de diferentes especies de árboles, de los cuales 2,63% fueron aislamiento positivos: el 56,5% serotipo B, 24,7% serotipo C y 18,8% serotipo A. La prevalencia de los serotipos varió entre las ciudades. Los resultados sugieren que las condiciones climáticas ambientales, principalmente la humedad, la temperatura, la evaporación y la radiación solar, pueden afectar la ocurrencia de los diferentes serotipos en los árboles de una manera diferencial (Granados, 2006).

Montería (Córdoba) presenta un clima cálido con temperaturas entre 28 y 35°C, y humedad relativa de 85% con una precipitación anual de 1200 a 2500 mm, en esta ciudad se realizó un muestreo ambiental entre los meses de septiembre de 2008 y septiembre de 2009, recolectaron 2445 muestras de almendro y se aisló *C.gattii* en 217 muestras ambientales, que correspondió a 8,9%, demás muestras positivas se clasificó como *Cryptococcus* spp. Se utilizó CGB para la determinación de la especie. La mayoría de las muestras positivas fue en flor y corteza posiblemente por la presencia de compuesto polifenólicos como taninos y lignina sirviéndole de sustrato a la levadura. Los árboles de la zona Sur y Centro presentaron un mayor grado de madurez presentando más tejido lignificado y carotenoides lo que tal vez influyó en los resultados; a diferencia de la zona Norte los árboles son jóvenes mostrando cortezas más lisas y menor cantidad de ranuras (Contreras et al., 2011).

En los años 2008- 2009 en la ciudad de Cúcuta se recolectaron un total de 4.389 muestras de árboles, donde tres (0,07%) fueron positivas para *C. gattii* (un aislamiento de serotipo B (VGI/a), tres aislamientos de serotipo C (VGIII/α)) y tres (0,07%) para *C. neoformans* var. *grubii* de serotipo A (VNI/α) asociados con *Ficus*

sp., la variedad *grubii* se recuperó a temperaturas de 28.1°C, 28.8°C y 29.8°C, con humedades relativas de 61%, 72% y 69% (Firacative et al., 2011).

3. MARCO TEORICO

3.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE *Cryptococcus*

C. neoformans es uno de los hongos patógenos humanos más comunes que es un basidiomiceto; es evolutivamente divergente de los ascomicetos patógenos más comunes (ej. *Cándida albicans*) y está estrechamente relacionados con los hongos que pudren madera (ej. *Phanerochaete chrysosporium*; *Coprinus cinereus*). *C. neoformans* elabora dos factores de virulencia especializados, la cápsula de polisacárido, que inhibe la fagocitosis, y la melanina que sirve como un antioxidante. El hongo también puede presentar reproducción sexual y formar basidiosporas sexuales, al parecer ocurre con mucha menos frecuencia en la naturaleza que la reproducción asexual o vegetativa. Existen pocos agentes antifúngicos para combatir la criptococosis; y las cepas resistentes a los medicamentos están surgiendo (broadinstitute.org).

C. neoformans se caracteriza por ser una levadura encapsulada cremosa, de color marrón, ovoide o redondeada de 4 a 6 μm de diámetro, asimila muy bien la creatinina desaminasa, por el contrario *C. gattii* presenta levaduras de forma alargada, color marrón, mas mucoides y más húmedas, crece en medio L-Canavanina- Glicina- azul de Bromotimol (CGB) utilizando la glicina como única fuente de carbón y nitrógeno liberando amonio que es el responsable del cambio del color, además la resistencia a la L-canavanina se atribuye a la presencia de un sistema enzimático capaz de degradarla y convertirla en compuesto no tóxico (Kwon-Chung et al., 1982); los medios cultivo deben estar excluidos de cicloheximida pues inhiben su crecimiento (Baró, 2002).

3.2. FACTORES DE PATOGENICIDAD

3.2.1. Cápsula: es el factor principal asociado a la virulencia, está compuesta por el 90 a 95% de glucoroxilomanano (GXM), alrededor de 5.8% de galactaxilomanano (GalXM) y una pequeña porción de manoproteínas (MP). Las diferencias en la estructura de GXM determinan los serotipos de *C. neoformans* y *C. gattii*. Los polisacáridos de la cápsula se pueden encontrar unidos a la célula que forma la estructura física, y se liberan al medio, como exopolisacáridos, confiriéndole al hongo beneficios como protección contra la desecación y depredadores ambientales (Zaragoza et al., 2009).

3.3. ENZIMAS EXTRACELULARES

3.3.1 Ureasa

Su función es regular el pH para permitir el paso de la levadura a través de la barrera hematoencefálica facilitando su establecimiento dentro de hospedero (Alvarado, 2008).

3.3.2 Fenoloxidasa

La melanina es un pigmento color marrón, no solo puede ser producida por la fenoloxidasa sino también por la lacasa, mediante la polimerización de de metabolitos producidos por la biodegradación de los compuestos difenólicos. Una vez localizada en la pared celular ayuda a mantener la integridad de la célula además de estar asociada a la virulencia. La lacasa les permite sintetizar melanina

a partir de sustratos precursores como L-DOPA, dopamina, norepinefrina y epinefrina. (Torres Rodríguez, 2010).

3.3.3 Proteasas

Las proteasas es un indicador de virulencia en varios organismos patógenos. Tienen la capacidad de degradar colágeno, elastina, fibrinógeno, inmunoglobulinas y factores del complemento, permitiéndole al hongo generar daño en tejidos, proveerse de nutrientes y le confiere protección del hospedero (Torres Rodríguez, 2010).

3.3.4 Fosfolipasas

Numerosas cepas patógenas secretan fosfolipasas, las cuales son un grupo heterogéneo de enzimas que hidrolizan uno o más enlaces éster en los glicerofosfólidos, cada enzima tiene la habilidad de romper una unión éster específica. Estas enzimas favorecen la desestabilización de las membranas y lisis celular de las células del hospedero, ayudando a la propagación del hongo (Torres Rodríguez, 2010).

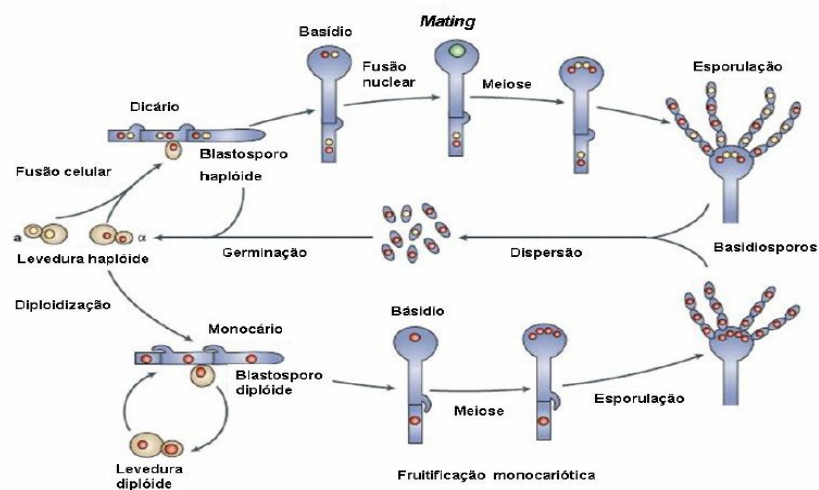
3.4. CICLO BIOLÓGICO DE *C. neoformans* y *C.gattii*

Las levaduras de *C.neoformans* son habitualmente haplóides sin embargo estos hongos pueden presentar una transición dimórfica y producir una forma filamentosa a través de dos rutas diferentes como la fructificación dicariótica y monocariótica para un mayor acceso a nutrientes. Poseen un sistema de apareamiento bipolar codificado para las formas alélicas de tipo a y α (alfa). Éste ciclo biológico ocurre cuando las células haplóides a y α se unen para iniciar una

transformación dimórfica como un desenvolvimiento de una forma filamentosa que crece como una hifa dicariótica a y/o α . Una hifa aérea puede formar un basidio y luego sufrir meiosis, dando origen a células hijas haplóides o basidiosporas. Éste proceso de apareamiento a y α fue observado en todos los serotipos en filamentación y producción de esporas (Kwon-Chung, 1975). La mayoría de aislamientos clínicos y ambientales poseen un apareamiento α se ha considerado más virulento que el apareamiento a.

Las células de *Cryptococcus spp.*, también pueden sufrir filamentación en ausencia de un apareamiento, este proceso se conoce como fructificación monocariótica, sucede lo contrario cuando células de un mismo apareamiento sufren diploidización, ocurriendo al final la meiosis que lleva a una formación de basidiosporas sésiles. Una fructificación monocariótica debe ofrecer una ventaja de sobrevivencia al hongo, particularmente son condiciones de cambios ambientales como reducción de nutrientes especialmente de nitrógeno y desecación (Heitman, 2006; Kwon-Chung, 1975).

Figura 1: Ciclo Biológico de *C. neoformans* y *C.gattii*

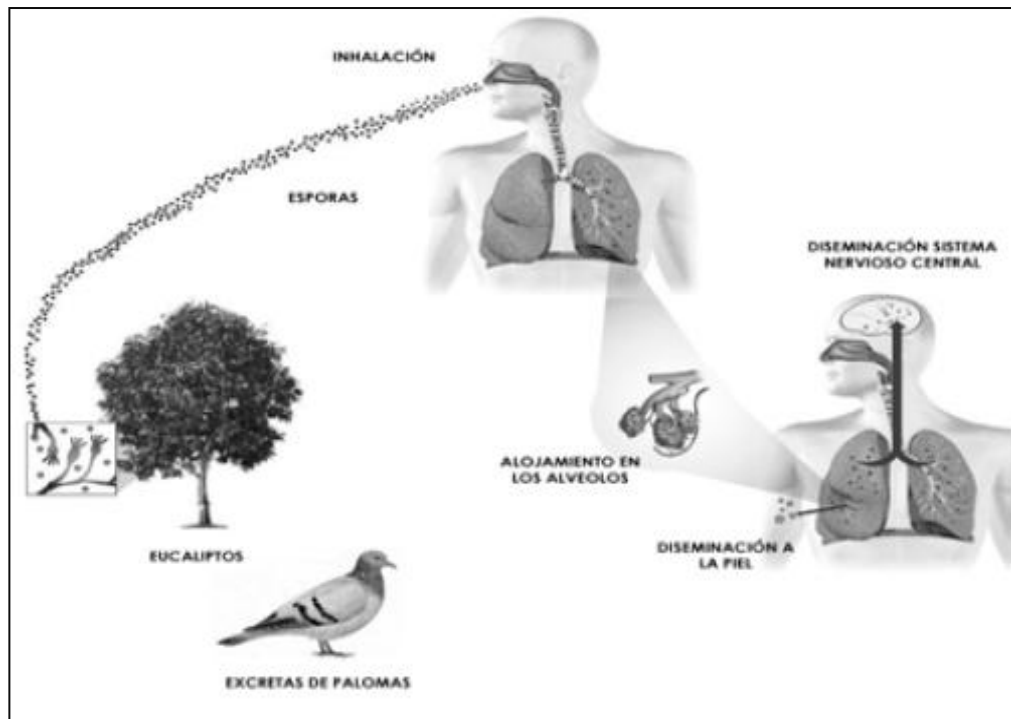


Fuente (Goulart, 2009)

3.5. MODO DE INFECCIÓN

Las especies patógenas de *C.neoformans* que se encuentran en el ambiente, durante su crecimiento y desarrollo liberan propágulos en forma de aerosol que son inhalados por el hombre y los animales, ingresando por la vía respiratoria alojándose en los pulmones y diseminándose hacia el resto del cuerpo especialmente al sistema nervioso central (figura 2).

Figura 2: Mecanismo de infección de *Cryptococcus*



Fuente (Tello, 2013)

La cápsula y la producción de varias enzimas le confieren protección y resistencia al hongo dentro del hospedero, siendo potencialmente tóxicas para las células

fagocíticas del individuo, afectando también las células microgliales, neutrófilos, monocitos y astrocitos con el fin de extenderse y burlar el sistema inmune (Goulart, 2009; Torres Rodríguez, 2010). Las bases del neurotropismo del complejo *C. neoformans* no están bien elucidadas pero involucran las catecolaminas (la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina) que están presentes en el torrente sanguíneo las cuáles son excelentes sustratos para la enzima fenoloxidasa o lacasa permitiendo la evasión de las defensas del hospedero. Además las células fagocíticas que están en el sistema nervioso central (SNC) son efectivas contra el hongo, pero su actividad depende de la presencia de opsoninas (entre ellas inmunoglobulinas IgG e IgA), éstas son un puente entre la partícula a fagocitar y el fagocito (Feldmesser et al., 2000; Illnait Zaragoz, 2012).

3.6. VARIEDAD Y CARACTERIZACIÓN MOLÉCULAR

La serotipificación se basa en las diferencias antígenas de polisacáridos presentes en la cápsula del hongo (Duarte, 1994), por consiguiente se presentan dos variedades para la especie *C. neoformans*: *var. grubii* con serotipo A, y *var. neoformans* con serotipo D, el híbrido con serotipo AD. La especie *C. gattii* presenta serotipos B y C (Meyer et al., 2003). Actualmente existen híbridos interespecies como AB (Bovers et al., 2008) y BD (Bovers et al., 2006) aislamientos poco frecuentes a nivel clínico.

Existen ocho patrones moleculares: *C. neoformans* VNI (*var. grubii*, serotipo A), VNII (*var. grubii*, serotipo A), VNIII (serotipo AD), VNIV (*var. neoformans*, serotipo D). La especie *C. gattii* (serotipos B y C) VGI, VGII, VGIII y VGIV (Meyer et al., 2003; Meyer et al., 1999).

Los patrones moleculares pueden ser identificados mediante la prueba de PCR huella digital: *C.neoformans* (VNI-VNIV) y *C.gattii* (VGI-VGIV) con iniciadores universales como el M13, (GACA)₄ y (GTG)₅ (Meyer et al., 1999), el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP): *C.neoformans*: var.*grubii* (VNI/AFLP1, VNII/AFLP1A), var.*neoformans* (VNIV/AFLP2) y el híbrido AD (VNIII/AFLP3), por su parte *C.gattii* (VGI/AFLP4, VGII/AFLP5, VGIII/AFLP6, VGIV/AFLP7) (Boekhout et al., 2001), el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen *URA5*: *C.neoformans*: var.*grubii* (VNI, VNII), var.*neoformans* (VNIV), híbrido AD (VNIII); *C.gattii* (VGI, VGII, VGIII y VGIV) (Meyer et al., 2003), RFLP del gen *PBL1*: *C.neoformans*: var.*grubii* (VNI/A1, VNII/A2), var.*neoformans* (VNIV/A4) y el híbrido AD A3 (VNIII/A1, A4), por su parte *C.gattii* (VGI/A5, VGII/A6, VGIII/A7, VGIV/A8) (Latouche et al., 2003).

Recientemente se ha implementado la tipificación de secuencias multilocus (MLST) empleando siete loci genéticos (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* y la región *IGS1*) como herramienta más robusta para la caracterización molecular de los aislamientos de éste hongo.

Estas técnicas han permitido agrupar los miembros del complejo según su especie/variedad ofreciendo ventajas como la facilidad y rapidez de caracterizar los aislamientos de *Cryptococcus* (Meyer et al., 2009).

3.7. ECOLÓGIA

Las levaduras de las especies *C. neoformans* y *C. gattii* son saprofitas de vida libre capaces de sobrevivir en diversos nichos ecológicos pero su dispersión en el aire puede ser favorecida o afectada por factores como la temperatura, humedad del aire y velocidad del viento (Ríos, 2011).

Los numerosos aislamientos de *C. neoformans* se reportan principalmente en excretas de paloma (*Columbia livia*) debido a sus componentes como la creatinina, xantina, urea y nitrógeno; en las heces acumuladas y protegidas de los rayos ultravioletas del sol se pueden detectar concentraciones de hasta $2-3 \times 10^6$ células/g (Hamasha et al., 2004), solo si se renueva la fuente de nitrógeno pueden sobrevivir hasta un año, mientras que en las excretas frescas se inhibe o son muy escasas la levaduras debido a la alta concentración de amonio (Alvarado, 2008).

Los reportes ambientales de *C.gatii* son cada vez más frecuentes en distintas especies de árboles, en diferentes familias como en géneros, se ha descrito una asociación ecológica estrecha debido a que degrada biopolímeros como el inositol y la lignina utilizados como fuente de desarrollo (Castañon, 2013; Lazera, 2000).

3.8. EPIDEMIOLOGIA CLINICA

A principios de la década de 1980, fecha en la cual se produjo la aparición de la inmunodeficiencia causada por el VIH/SIDA, se incrementaron los reportes de la criptococosis, anteriormente ocurría esporádicamente en todo el mundo (Mitchell and Perfect, 1995). Se debe resaltar que no todos los individuos desarrollan la enfermedad debido a que se presentan tres factores fundamentales como el estado de los mecanismos de defensa del hospedador, la virulencia de la cepa infectante y la cuantía del inóculo (Casadevall, 2007; Illnait Zaragoz, 2012).

La criptococosis también puede desarrollarse en pacientes que sufren enfermedades de tejido conectivo como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoidea, las personas que reciben trasplantes de órganos sólidos y consumen altas dosis de corticoesteroides, diabetes mellitus, leucemias, linfomas, sarcoidosis, cirrosis, enfermedades pulmonares crónicas, casos que comprometen

el sistema inmune. Ésta micosis oportunista puede causar lesiones principalmente en el sistema nervioso central siendo la causante de la meningoencefalitis presentando criptococomas (lesiones granulomatosas) localizados a nivel de hemisferios cerebrales, cerebelo o médula espinal, también puede causar criptococosis cutánea primaria con lesiones solitarias o confinadas a las manos y áreas descubiertas, la cutánea secundaria se presenta por vía hematógica del hongo a la piel. También puede causar lesiones oculares hasta el punto de perder la visión por completo; infecciones óseas, riñón, y en boca (Pérez, 2003; Tello et al., 2013).

En el mundo la mayoría de las infecciones en pacientes inmunodeprimidos son causadas por el serotipo A, pero el aislamiento de cepas de serotipo D en pacientes con SIDA ha sido limitado principalmente a Europa. En Brasil, el 4,5% de todas las infecciones oportunistas en pacientes con SIDA han sido reportadas por *C.neoformans*. La epidemiología de la infección criptocócica es importante, ya que proporciona pistas sobre la patogénesis de las infecciones y permite una evaluación del riesgo de infección en una población (Casali et al., 2003).

En México el 85% de los aislados fueron var.*neoformans* y el 15% fue *C. gattii*, porcentajes similares se han reportado en Brasil, aún cuando otro reporte brasileño muestra una mayor proporción de *C.gattii* en pacientes con SIDA. En Venezuela, de 27 aislamientos de *C.neoformans* de diferentes sitios del país, se encontró que 63% de los casos eran del serotipo A, 29.6% del serotipo B, 3.7% del serotipo D y 3.7% del serotipo C (Pérez, 2003).

(Lizarazo et al., 2007) para el periodo de 1997- 2005 realizó un estudio clínico-epidemiológico, en el cual recogió 931 encuestas de 76 centros identificando 891 (95.7%) casos de neurocriptococosis, 27 (2.9%) de formas pulmonares, 5 (0.5%) de lesiones cutáneas, 2 (0.2%) de ganglionares, 2 (0.2%) de úlceras orofaríngeas

y un caso (0.1%) de otras manifestaciones clínicas. De los 788 aislamientos remitidos, 95.9% fueron *C. neoformans* var.*grubii* serotipo A, 0.3% var.*neoformans* serotipo D, 3.3% *C. gattii* serotipo B y 0.5% *C. gattii* serotipo C.

En Colombia durante el periodo 2006- 2010 se recogieron 521 encuestas con las cuales se realizó un estudio epidemiológico retrospectivo. En 474 encuestas se informaron manifestaciones clínicas; las más frecuentes fueron: cefalea (84.5%), fiebre (63.4%), náuseas y vómito (57.5%), alteraciones mentales (46.3%), signos meníngeos (33%), tos (26.4%) y alteraciones visuales (24.5%). La neurocriptococosis se reportó en 81.8% de los casos. De 413 aislamientos recuperados, 95.6% fueron var.*grubii*, 1% var.*neoformans*, y 3.4% *C. gattii*. El factor de riesgo predominante fue infección por VIH (83.5%) y la criptococosis definió el sida en 23% de los casos. La incidencia promedio anual de criptococosis en la población general fue de 2,4 por un millón de habitantes/año mientras que en pacientes con sida, aumentó a 3,3 por 1.000 habitantes/año (Escandón et al., 2012).

En la ciudad de Popayán se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo de historias clínicas de pacientes con diagnóstico de criptococosis meníngea, ingresados al Hospital Universitario San José durante un periodo comprendido entre 1998 y 2012. Fueron 12 casos estudiados, la edad promedio encontrada fue de 39 años, el factor predisponente más frecuente fue VIH/SIDA con un 58.3%. La sintomatología presentada fue cefalea con un 91.7% y la presencia de signos meníngeos con un 33.3%. El diagnóstico fue positivo para *C. neoformans* en el 91.7%, mientras que en el 8,3% restante se aisló *C. gattii*. De los pacientes ingresados al estudio el 66.7% sobrevivió y el 33.3% restante había fallecido al término del estudio (Bastidas et al., 2013).

3.9. ESPECIES DE ÁRBOLES

Los aislamientos de *C.gattii* en diferentes especies de árboles confirma la estrecha relación con los mismos, mientras que *C. neoformans* está más asociada a excretas de aves además de ser cosmopolita, pero diversos estudios han logrado su recuperación a partir de muestras vegetales.

3.9.1. *Calliandra purdiaei* (Carbonero, Florito)

De la familia fabaceae – mimosoideae, nativa de Colombia y Venezuela, son árboles o arbustos que crecen cerca de los 1400 metros sobre el nivel del mar, por su altura, belleza de sus flores y estambres rosados, se recomienda para antejardines, parques, avenidas, separadores de calles, es una especie muy valiosa como ornamental (Rojas, 2011).

3.9.2. *Tabebuia sp.* (Guayacán)

Originaria de América tropical, es muy apreciada como ornamental (Rojas, 2011), Crece en bosques húmedos de tierras bajas, bosques de galería, bosques secos y bosques de montaña (Calle, 2008). Familia: Bignoniaceae. Crecimiento: rápido con raíz profunda y tallo recto de corteza fisurada, flores grandes muy llamativas, de color amarillo y rosado, fruto habichuela alargada, además cuando se produce la defoliación, la hojarasca provee gran cantidad de materia orgánica al suelo (Vargas and Molina, 2007).

3.9.3. *Mangifera indica* (Mango)

Especie originaria de la india, pertenece a la familia anacardiaceae, es de crecimiento más o menos rápido, soporta suelos ácidos, áridos y erosionados, además requiere de abundante luz solar para su desarrollo. También es recomendado como árbol ornamental (Rojas, 2011).

3.9.4. *Eucalyptus sp.* (Eucalipto)

Originario de Australia, este árbol crece hoy en la mayoría de las regiones templadas del planeta gracias a su alta capacidad de adaptación a diferentes ecosistemas y a sus múltiples usos, tanto industriales como medicinales. Debido a su alta resistencia a las plagas y a las enfermedades, y por su gran capacidad para sobrevivir en suelos pobres, así como en zonas de alta contaminación atmosférica, ha sido adoptado para zonas urbanas (Morales, 2007).

3.9.5. *Terminalia catappa* (Almendro)

De la familia combretaceae, nativo de la india, las islas de Andamán, Indochina, Malasia, Indonesia, el norte de Australia, Oceanía, las Filipinas y Taiwán. La especie se ha naturalizado y se planta extensamente en las tierras bajas de regiones tropicales en el resto del mundo. Los valores de pH de los suelos son por lo usual de neutrales a moderadamente alcalinos y ricos en bases sin embargo, puede crecer también en suelos fuertemente ácidos y de uso ornamental (Francis, 1989; Rojas, 2011).

3.9.6. *Ficus benjamina* (Caucho, Ficus)

De la familia moraceae, nativo de India, China y Malasia, que alcanza 35 metros de altura y 25 metros de diámetro de copa; sus raíces son extendidas, superficiales e incluso aéreas, se emplea como especie ornamental (Rojas, 2011). Especie introducida y plantada profusamente en el trópico americano, pues produce grandes cantidades de látex, material vegetal requerido en la fabricación del caucho (llantas, impermeables, etc.); muypreciado antes de la invención del caucho sintético(Vargas and Molina, 2010).

3.9.7. *Cassia fistula* (Caña fistula, Lluvia de oro)

De familia fabaceae – caesalpinioideae, originaria de la India, distribuido y cultivado en América Tropical y Subtropical en las regiones correspondientes al Pacífico Seco. Sus flores son llamativas por su coloración amarilla o amarillo-dorado. Vistasas, fragantes, agrupadas en racimos terminales y colgantes; especie recomendada para parques, calles y zonas verdes (Hoyos, 1992; Rojas, 2011).

3.9.8. *Spathodea campanulata* (Tulipán africano)

Pertenciente a la familia bignoniaceae, tiene crecimiento rápido y presenta un corto periodo de vida (Rojas, 2011).Especie originaria de África ecuatorial (Ghana, Angola, Sudán, Uganda) que alcanza hasta 30 metros de altura y 10 metros de diámetro de copa, posee una raíz muy agresiva, tipo rizoma, que se extiende de manera superficial o subterránea en muchas direcciones. En los extremos de estas raíces horizontales muy largas (hasta de 100 metros), emergen nuevos

individuos (árboles) que a su vez, se reproducen de la misma manera, se emplea como especie ornamental (Vargas and Molina, 2010).

3.9.9. *Ochroma pyramidale* (Balso, Balsa, Palo de balsa)

Nativo de América trópic, frecuentemente en áreas intervenidas y degradadas; de uso ornamental por ello se recomienda en parques, zonas verdes; utilizado para restaurar áreas degradadas, no se recomienda para separadores de calles ni en avenidas por ser de corta vida (Rojas, 2011).

3.9.9.1. *Cananga odorata* (Ylang-Ylang, Cadmio)

Pertenece a la familia annonaceae, ésta especie es nativa del sur de la India, Java, las Islas Filipinas, el Archipiélago Malayo y las islas tropicales del Pacífico. Se encuentra escasamente propagada en los trópicos pero se ha naturalizado en países como Cuba, Puerto Rico e Islas Vírgenes, recientemente se ha cultivado en Centro y Suramérica; utilizada principalmente como planta ornamental (Rojas, 2011).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer la presencia de *C. neoformans* / *C. gattii* en especies vegetales arbóreas en el perímetro urbano de seis cabeceras municipales del departamento del Cauca.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar *C. neoformans* / *C. gattii* a partir de especies vegetales arbóreas en el perímetro urbano de seis cabeceras municipales del departamento del Cauca.
- Caracterizar el fenotipo y genotipo de los aislamientos ambientales de *C. neoformans* / *C. gattii* mediante pruebas convencionales, PCR huella digital con el iniciador (GTG)₅, y RFLP con el gen URA5.
- Explorar y describir las condiciones ambientales (humedad relativa y temperatura) que pueden estar relacionadas con la presencia de *C. neoformans*/*C. gattii* en seis cabeceras municipales del departamento del Cauca.

5. METODOLOGIA

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio epidemiológico que se realizó fue de tipo descriptivo ecológico, fenotípico y molecular, en el cual se planteó caracterizar muestras ambientales en el perímetro urbano de seis cabeceras municipales del departamento del Cauca.

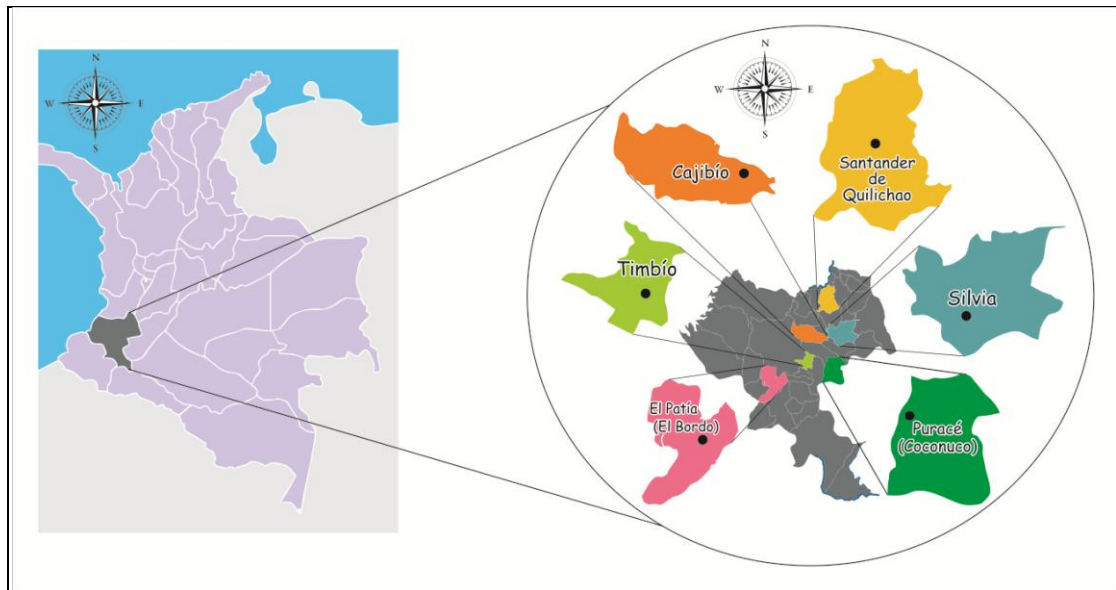
5.2. ÁREAS DE ESTUDIOS

Este estudio se enmarca en el proyecto “Predicción de posibles áreas endémicas para *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* en Colombia: modelo ecológico de áreas en riesgo” a cargo del Grupo de investigación de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, cofinanciado por Colciencias (código: 2011-3600115683): el presente estudio se realizó en el departamento del Cauca en seis cabeceras municipales: Bordo, Cajibío, Coconuco, Tímbio, Santander de Quilichao y Silvia.

5.3. DESCRIPCIÓN DE ÁREAS DE ESTUDIO:

La posición geográfica en las que están ubicadas las diferentes cabeceras municipales estudiadas (figura 3) permite clasificarlas en los distintos pisos térmicos (anexo D) como el cálido dentro del cual está Bordo y Santander de Quilichao, en el templado Cajibío y Tímbio, en el frío Coconuco y Silvia.

Figura 3: Ubicación geográfica de las cabeceras municipales en el departamento del Cauca.



Tomado y adaptado de www.sogeocol.edu.co

Tabla 1: Caracterización física de las cabeceras municipales

| Municipio | Coordenadas | Altura | Limites |
|------------------------|-----------------------------------|---------------|--|
| Santander de Quilichao | N 3° 00' 21,48"; W 76° 28' 59,76" | 1081 m.s.n.m. | Norte: Villarrica- Jamundí; Sur: Caldono Occidente: Buenos aires; Oriente: Caloto |
| El Bordo | N 2° 6' 47,44"; W 76° 59' 13,57" | 990 m.s.n.m. | Norte: El Tambo; Sur: Mercaderes Occidente: Balboa; Oriente: La Vega |
| Timbío | N 2° 21' 5,47"; W 76° 40' 59,24" | 1831 m.s.n.m. | Norte: Popayán; Sur: Rosas Occidente: El Tambo; Oriente: Sotará |
| Cajibío | N 2° 37' 22,72"; W 76° 34' 11,74" | 1800 m.s.n.m. | Norte: Piendamó; Sur: Popayán Occidente: Morales ; Oriente: Totoró |
| Silvia | N 2° 36' 38,49"; W 76° 22' 43,52" | 2600 m.s.n.m. | Norte: Jambaló; Sur: Totoró Occidente: Piendamó; Oriente: Inzá |
| Coconuco | N 2° 20' 51,2"; W 76° 29' 58,5" | 2400 m.s.n.m. | Norte: Popayán ; Sur: San Agustín Occidente: Sotará ; Oriente: Argentina |

5.4. DATOS ECOLÓGICOS.

En cada uno de los sitios se registró los factores ambientales como la temperatura (°C), la humedad (%) y altura sobre el nivel mar.

5.5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

En las cabeceras municipales de Bordo, Cajíbio, Coconuco Tímbio, Santander de Quilichao y Silvia, se realizó un muestreo entre los meses de julio y agosto del 2013 de árboles localizados en el perímetro urbano (parques, calles, laderas de ríos, lugares ecológicos); en promedio se colectaron 30 individuos por cada municipio; se recolectaron tres muestras por cada árbol: hojas, corteza, y tierra, utilizando un baja ramas, pala jardinera y navaja, después se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético y su respectivo marcaje. Las muestras se trasladaron al laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud donde fueron procesadas con la técnica de extracción fosfato salino (Escandón et al., 2005).

En la cabecera municipal donde el hongo se recuperó, se realizaron nuevamente 4 muestreos para confirmar la permanencia del hongo en el ambiente, en el mes de noviembre del 2013 y entre enero-abril del 2014, recolectando muestras vegetales arbóreas positivas para el hongo.

5.6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El procesamiento de muestras se realizó según el protocolo estandarizado por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud de la siguiente manera: se

pesaron 5 g de cada muestra en un tubo falcón de 50 ml y se resuspendieron en 25 ml de solución tampón fosfato salino (PBS), se mezclaron durante 30 minutos y se filtraron mediante una gasa estéril a un tubo falcón de 15 ml. Posteriormente, al filtrado se le adicionó 100 µl de cloranfenicol (4g/100ml). A partir de la anterior solución se hizo siembra masiva de 100 µl en medio de cultivo agar *Guizotia abyssinica* (50 g de semillas Niger, 1g de creatinina, 1g de fosfato de potasio y 15 g de agar bacteriológico en 1L de agua destilada) suplementado con 25 ml de bifenil (1g/25ml), 2 ml de cloranfenicol (4g/100ml), 1 ml de amikacina (250mg/1ml), la cual se incubó a 28 °C por un periodo de 10 días con observación diaria.

5.7. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Las colonias melanoides que presentaron color café en el medio de *Guizotia abyssinica* se re-sembraron en agar glucosado sabouraud, posteriormente se realizó la observación morfológica y luego se caracterizó mediante técnicas fenotípicas: producción de ureasa y se determinó la especie empleando el medio canavanina- glicina- azul de bromotimol (CGB) (Kwon-Chung et al., 1982). Las pruebas anteriores se incubaron a 27°C por 72 horas y lectura cada 24 horas.

5.8. CARACTERIZACIÓN MOLÉCULAR

Estas pruebas se realizaron según el protocolo estandarizado por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud de Colombia.

La determinación del patrón molecular de los aislamientos ambientales se efectuó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) huella digital con el iniciador (GTG)₅ (Meyer et al., 1999) y por análisis Polimórfico de Longitud de

Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen orotidina monofosfato pirofosforilasa (URA5) (Meyer et al., 2003).

Para llevar a cabo el proceso de las pruebas moleculares se inició con la siembra de los aislamientos en medio de cultivo YEPD (10 g peptona, 10 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa, 15 g de agar, en 1L agua estéril) con 48 horas de anticipación a la extracción del ADN.

5.8.1. Extracción de ADN

Las aislamientos que crecieron en YEPD se pasaron a tubos eppendorf con ayuda de un asa, luego se llevaron a -20°C por 1 hora, transcurrido el tiempo a cada uno de los tubos se agregaron 500 μl de buffer de lysis (1 M Tris-HCl, 1,25 M NaCl, 0,25 M EDTA, pH 8,0) posteriormente se incubó a (65°C) por 1 hora (realizando agitaciones cada 30' durante 2 minutos), luego se adicionó 500 μl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) frío para precipitar el ADN después de la centrifugación a 13500 rpm durante 15 min a 4°C , el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se añadió un volumen igual de isopropanol frío, el ADN precipitó a -20°C por una hora, y se sedimentó a 13000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos. El ADN se secó a temperatura ambiente, las muestras se suspendieron en 50 μl de TE y se almacenó a 4°C .

5.8.2. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen URA₅

Esta prueba se realizó a una concentración de 500ng/μl de ADN con el fin de establecer la presencia del gen URA5. La PCR se trabajó a un volumen final de 50μl. Se utilizaron ependorff de 0.5 ml; a cada tubo ependorff se agregó: 5μl de buffer (albúmina suero bovino (BSA)), 4.5μl de MgCl₂, 0.5μl de DNTPs, de cada cebador URA5 (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') y SJ01 (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3') se agregó 5μl respectivamente, 0.3μl de Taq polimerasa, 24.7μl de agua de PCR y 5μl de ADN. Las condiciones de amplificación se realizaron durante 35 ciclos y se describen a continuación:

Tabla 2: Condiciones de amplificación, Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen URA₅.

| Condiciones PCR- URA₅ “35 ciclos” | |
|---|--------------------------|
| Desnaturalización inicial | 91°C durante 3 minutos |
| Desnaturalización | 94°C durante 45 segundos |
| Anillamiento | 62°C durante 1 minuto |
| Extensión | 72°C durante 2 minutos |
| 1 Ciclo final de extensión | 72°C durante 10 minutos |
| Ciclos de enfriamiento | 4°C por 24 horas |

Los productos se analizaron por electroforesis con geles de agarosa al 1.4% en 10 X Tris- borato (TBE) tampón a 110 V durante una hora y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta para la toma de la fotografía. 30μl de producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción HhaI y Sau96 empleadas para la

amplificación de los productos obtenidos a 37°C durante toda la noche y se separaron por electroforesis a 2.5% en Tris- borato (TBE) tampón a 80 V durante 3.5 horas. Los patrones de RFLP fueron asignados a los principales tipos moleculares (VNI- VNIV y VGI- VGIV) visualmente, comparándolos con los patrones obtenidos de las cepas de referencia (Meyer et al., 2003).

5.8.3. PCR huella digital (GTG)₅

Esta prueba se trabajó a una concentración de 10ng/μl de ADN y volumen final de 50μl, utilizando como único cebador (GTG)₅.

A cada tubo ependorff se agregó: 5μl de buffer de PCR, 4μl de (GTG)₅, 3μl de NaAC, 2μl de MgCl₂, 1μl de BSA, 0.5μl de DNTPS, 0.5μl de Taq polimerasa, 31.5μl de agua de PCR y 2.5μl de ADN.

Tabla 3: Condiciones de amplificación, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) huella digital de la secuencia (GTG)₅.

| Condiciones PCR- (GTG) ₅ “35 ciclos” | |
|---|--------------------------|
| Desnaturalización inicial | 91°C durante 3 minutos |
| Desnaturalización | 94°C durante 20 segundos |
| Anillamiento | 50°C durante 1 minuto |
| Extensión | 72°C durante 20 segundos |
| 1 Ciclo final de extensión | 72°C durante 6 minutos |
| Ciclos de enfriamiento | 4°C por 24 horas |

La amplificación de los productos se analizaron por electroforesis con geles de agarosa al 1.4% en 10X Tris- borato (TBE) a 80 V durante 3 horas y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta para la toma de la fotografía. Los patrones de PCR huella digital con la secuencia (GTG)₅ fueron asignados a los principales tipos moleculares (VNI- VNIV y VGI- VGIV) visualmente, comparándolos con los patrones obtenidos de las cepas de referencia (Meyer et al., 2003).

5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se tabularon en el programa Excel ® Microsoft Corporation, se analizaron las variables categóricas.

6. RESULTADOS

6.1. MUESTRAS AMBIENTALES

De un total de 1214 muestras vegetales obtenidas de varias especies de árboles (anexo K) del perímetro urbano (parques, calles, laderas de ríos, lugares ecológicos) entre seis cabeceras municipales del departamento del Cauca, en los meses de Julio, Agosto, Noviembre del 2013 y Enero-Abril del 2014, 17 muestras fueron positivas para *C. neoformans* de las cuales el 23.5% fueron corteza, 52.9% tierra y 23.5% hojas en los municipios de Bordo y Coconuco en tres especies de árboles (Tabla 4), de las cuales se obtuvieron 65 aislamientos.

Tabla 4: Muestras positivas de Bordo y Coconuco

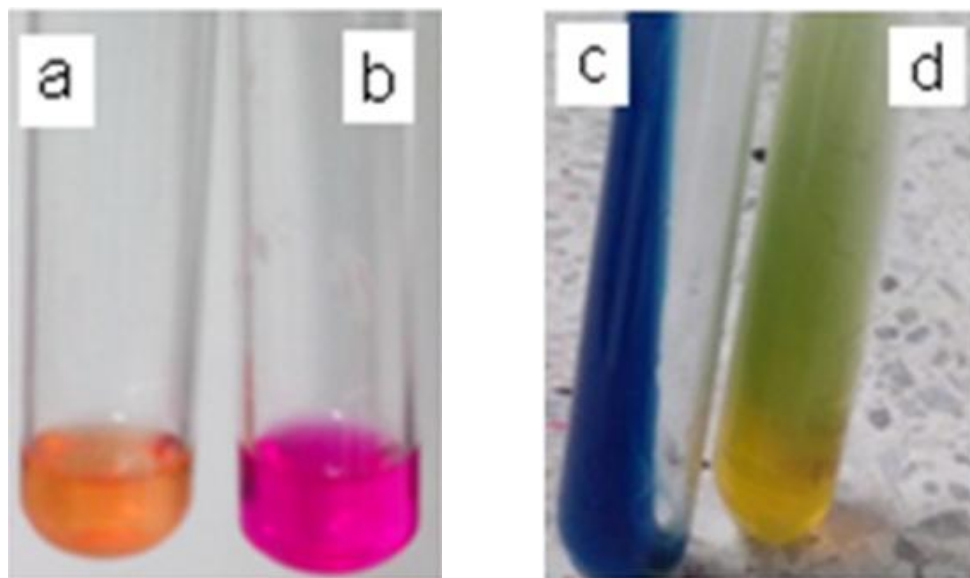
| Cabecera municipal | Especie de árbol | Hojas | Corteza | Tierra | Total |
|--------------------|---------------------------|-------|---------|--------|-------|
| Coconuco | <i>Eucalyptus grandis</i> | 2 | 0 | 6 | 8 |
| | <i>Pinus sp.</i> | 0 | 2 | 0 | 2 |
| Bordo | <i>Terminalia catappa</i> | 2 | 2 | 3 | 7 |
| Total | | 4 | 4 | 9 | 17 |

6.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Las colonias que mostraron coloración marrón en medio de cultivo agar *Guizzotia abyssinica*, se repicaron en agar glucosado de Sabouraud. Los aislamientos ambientales recuperados se conservaron a -70°C en glicerol al 10% en el Grupo de Microbiología.

La presencia de *Cryptococcus sp* se confirmó por la prueba de urea; la especie se determinó por CGB siendo negativa para *C. neoformans* (var. *grubii* o var. *neoformans*) y positiva para *C. gattii*. Para cada prueba se montaron controles positivos y negativos para garantizar la idoneidad de los resultados Figura 4.

Figura 4: Evaluación de la producción de la enzima ureasa (a-b) y CGB(c-d).



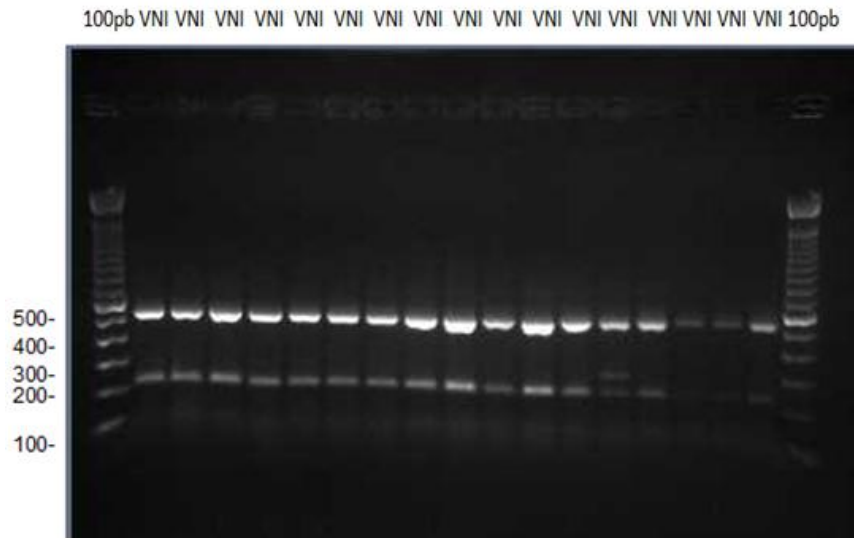
a) Prueba negativa; b) Prueba positiva c) Prueba positiva; d) Prueba negativa

Fotos: Nubia Enriquez

6.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

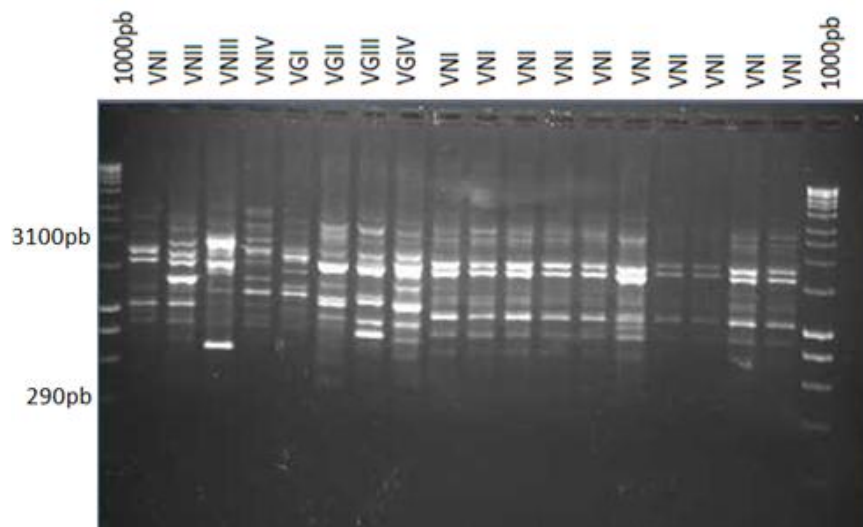
Se caracterizaron 65 aislamientos correspondientes a 17 muestras por RFLP del gen URA_5 y PCR huella digital $(GTG)_5$. Todos los aislamientos ambientales fueron patrón molecular VNI, las pruebas fueron el 100% consistentes (figura 5). Por cada prueba molecular empleada, se utilizó los patrones moleculares de VNI-VNIV y VGI-VGIV (Meyer et al., 2003).

Figura 5: Caracterización de aislamientos por RFLP-URA₅.



Carril 1 y 18: marcador molecular de 100pb; carril 2-17: aislamientos ambientales var. *grubii*.

Figura 6: Caracterización de aislamientos por PCR huella digital (GTG)₅.



Carril 1 y 20: marcador molecular de 1000pb; carril 2-5 cepas control VNI- VNIV; carril 6-9 controles VGI- VGIV; carril 10-19 aislamientos ambientales var. *grubii*.

6.4. CONDICIONES AMBIENTALES DE LAS CABECERAS MUNICIPALES

En la siguiente tabla se observa que Tímbo presentó el valor máximo de humedad relativa con respecto al valor presentado en Silvia, cabeceras municipales en las cuales no fue posible recuperar aislamientos. Mientras tanto en Bordo se reportó el valor máximo de temperatura recuperando un aislamiento, el valor mínimo se presentó en Silvia (Tabla 5).

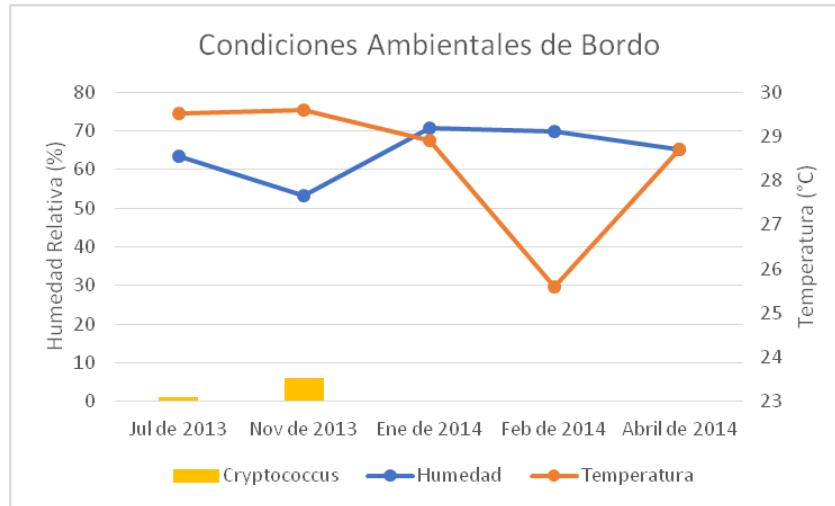
Tabla 5: Descripción de factores ambientales

| Municipio | Altura | Humedad | Temperatura |
|------------------------|---------------|---------|-------------|
| Santander de Quilichao | 1081 m.s.n.m. | 74% | 23.6 °C |
| Bordo | 990 m.s.n.m. | 64.5% | 29.5 °C |
| Tímbo | 1800 m.s.n.m. | 83% | 18.6 °C |
| Cajibío | 1831 m.s.n.m. | 70.7% | 18.3 °C |
| Silvia | 2600 m.s.n.m. | 60% | 15°C |
| Coconuco | 2400 m.s.n.m. | 64.1% | 17.2 °C |

6.5. CONDICIONES AMBIENTALES DE BORDO Y COCONUCO

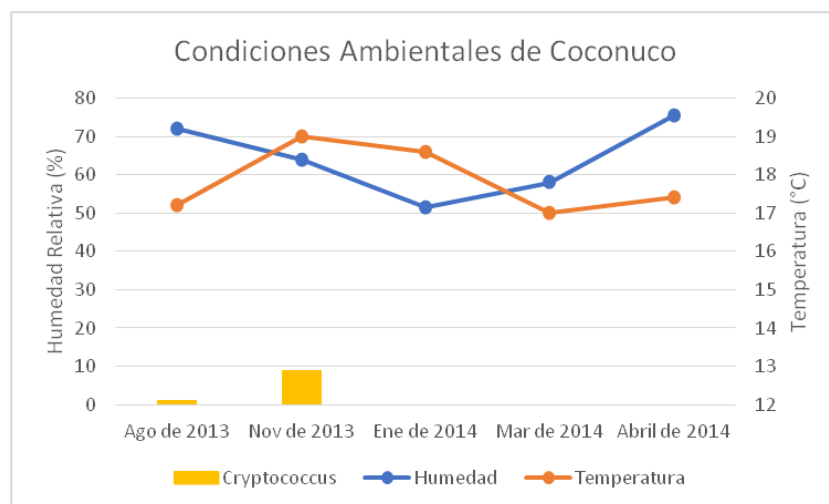
Las muestras positivas fueron recuperadas en el año 2013, en Julio con un solo aislamiento (1.01%), mes correspondiente a la temporada seca y en Noviembre con 6 muestras (6.45%), mes de altas lluvias. En los meses de Enero, Febrero y Abril del 2014 no se recuperó aislamientos (Figura 7).

Figura 7: Variables Ambientales Bordo



Las muestras positivas se recuperaron en el año 2013, en Agosto con un solo aislamiento (1.05%), mes correspondiente a la temporada seca y en Noviembre con 9 muestras (12%), mes de altas lluvias. En los meses de Enero, Febrero y Abril del 2014 no se recuperó aislamientos (Figura 8).

Figura 8: Variables Ambientales Coconuco



7. DISCUSION

El presente estudio demuestra que del total de 1214 muestras vegetales procesadas se obtuvo el 1.4% de positividad entre las especies de Eucalipto (*Eucalyptus grandis*), Pino (*pinus sp.*) y Almendro (*Terminalia catappa*), confirmando la presencia de la levadura en hojas, corteza y suelo, resultados que se relacionan con varios estudios como el de (Granados and Castañeda, 2005) quienes lograron aislar el patógeno de corteza a partir de *Eucalyptus camaldulensis*, también de detritus de *Pinus radiata*, *E. globulus*, *Ficus soatensis*, *Croton bogotanus*, *C.funckianus*, *Coussapoa sp.*, *Cupressus lusitanica* y *Acacia decurrens*; de igual forma (Castañeda et al., 2001) lo recuperó en detritos de almendro (*Terminalia catappa*); así mismo (Randhawa et al., 2008) en *Butea monosperma*, *Tamarindus indica*, *F.religiosa*, *Mangifera indica*.

Los datos obtenidos en ésta investigación demuestran que el suelo es el sustrato donde mayormente está albergado el patógeno seguido de corteza y finalmente hojas, lo que sugiere que es uno de los principales nichos para su colonización, este resultado se relacionó con el estudio realizado por (Firacative et al., 2011) en Cúcuta donde el hongo se encontró en el suelo, los autores concluyen que esto puede estar relacionado con la interacción de anfitriones no vertebrados como los nematodos y amebas, por ejemplo con *Acanthamoeba castellanii* y *Caenorhabditis elegans* (Malliaris et al, 2004; Steenbergen et al, 2001; Steenbergen, 2003).

Las investigaciones realizadas por (Escandón et al., 2005; Huérfano et al., 2003; Ordoñez, 1994) concuerdan con los datos obtenidos en este estudio en la confirmación de *Cryptococcus sp* por medio de la actividad de la ureasa, y la especie por CGB.

Los resultados de ésta investigación indican que los aislamientos ambientales recuperados pertenecen en un 100% al patrón molecular VNI, datos similares a estudios reportados en diferentes ciudades como Jabalpur en la india donde el 49.2% perteneció a VNI del 100% (Grover et al., 2007); en Argentina, de las 15 muestras positivas que correspondían al 3%, obtuvieron el 1,7% para VNI (Refojo et al., 2009); en Barcelona y Cataluña del 100% de muestras positivas resultaron VNI (Morera-López et al., 2005).

Estudios Colombianos e Iberoamericano (Escandón et al., 2012; Lizarazo et al., 2007; Meyer et al., 2003) evidencian la estrecha relación que existe entre los aislamientos clínicos y ambientales demostrando una mayor frecuencia de la *var.grubii*, serotipo A, tipo molecular VNI, y el más reportado en aislamientos ambientales siendo la causa principal de la criptococosis en pacientes inmunosuprimidos; ésto concuerda con los datos obtenidos en esta investigación donde el tipo predominante fue VNI.

Las variables ambientales reportadas durante los muestreos para cada una de las cabeceras municipales en el mes de julio-agosto del 2013 en este estudio, permitió recuperar el hongo únicamente en Bordo y Coconuco en época seca resultados que se relacionan con la investigación retrospectiva realizada por (Granados and Castañeda, 2006) en la cual analizaron la relación de los aislamientos ambientales y las condiciones climáticas de Colombia durante un periodo de 12 años desde 1999 a 2004, reportes de varios estudios ambientales realizados en diferentes especies de árboles en distintas ciudades como Bogotá, Cali, Cúcuta y Medellín, sugiriendo que la *var.grubii* es favorecida por la temporada seca, determinada por precipitaciones bajas, temperatura en promedio

altas, periodos prolongados de sol, y valores bajos de humedad relativa, deduciendo que esta variedad es termotolerante.

En cuanto a la prevalencia del patógeno durante los meses de muestreo se recuperó nuevamente y en mayor proporción en el mes de noviembre, resultados que son similares a los obtenidos por (Granados and Castañeda, 2005) en su estudio realizado en la ciudad de Bogotá, en el cual los aislamientos ambientales se recuperaron con mayor frecuencia en los meses de altas precipitaciones, pocas horas de brillo solar y temperaturas poco extremas, aunque en la mayoría del país se comporta así, se puede lograr aislar el hongo en menor proporción en la temporada seca. De acuerdo a lo anterior, independientemente del piso térmico, la temporada de altas lluvias presenta elevados porcentajes de humedad relativa siendo el clima frío predilecto por el hongo.

Aunque el estudio realizado por (Quintero et al., 2005) señala que las condiciones del piso térmico frío como el rango altitudinal entre 2000 y 3000 msnm con temperaturas que oscilan entre los 12 y 18°C favorecen el crecimiento del hongo en la naturaleza, esto está de acuerdo con el presente estudio para el caso de Coconuco el cual está ubicado a 2400 msnm en el que se aisló el hongo.

En comparación con otro estudio realizado en la India, donde la tasa de recuperación de *C.neoformans* disminuyó en la época de verano con respecto a los altos niveles de aislamientos presentados en la primavera (Randhawa et al., 2003), en el presente trabajo para los meses de enero, febrero-marzo y abril del 2014 no fue posible la recuperación del patógeno, lo que podría ser debido a la competencia con otras especies de bacterias u hongos y por ello se hizo difícil de recuperar (Fircative et al., 2011); aunque otras investigaciones demuestran que

el hongo es sensible a la radiación solar (UV) es decir se encuentra en condiciones de estrés que podría degradarlo o inhibir su crecimiento (Verma, 2013; Wang and Casadevall, 1994); por lo que se requiere realizar más muestreos durante un tiempo prolongado.

Colombia por su ubicación en el trópico y por ser un país altamente montañoso presenta gran variedad de climas (Eslava, 1993) además de presentar un régimen térmico bimodal con dos periodos lluviosos y dos periodos secos (Poveda, 2004), donde es posible recuperar la levadura fúngica durante todo el año como lo señalan estudios ambientales realizados en el país por (Callejas et al., 1998; Castañeda et al., 2001; Duarte et al., 1994; Escandón et al., 2005; Escandón, 2010; Firacative et al., 2011), pero especialmente en temporadas de lluvias acorde con lo encontrado en el presente estudio, mientras que en otras regiones como British Columbia (Canadá), Washington y Ortegón (EE.UU) hallaron el patógeno en la estación de invierno y verano (Datta et al., 2009).

No fue posible recuperar el hongo a partir de material vegetal en el resto de cabeceras municipales, resultados que podrían estar sesgados ya que se llevó a cabo un solo muestreo, lo que sugiere realizar estudios adicionales con el fin de aislar el patógeno.

El presente trabajo demuestra que no fue posible aislar *C.gattii* en ninguna de las cabeceras municipales en las que se llevó a cabo el estudio, resultados que están acorde con la investigación de (Fraser et al., 2006) realizada en las Islas de San Juan (EE.UU) en la cual ésta especie no fue detectada debido a que pudo estar presente pero a un nivel extremadamente bajo de tal forma que no se recuperó durante los muestreos.

Los resultados de esta investigación con respecto a la no recuperación de *C.gattii* también se pueden atribuir a que los árboles muestreados no presentaron algún tipo de descomposición donde es más probable encontrarlo como lo sugieren estudios realizados por (Castañeda et al., 2001; Halliday, 2003; Lazera, 2000), especie que biodegrada lignina sirviéndole de sustrato para el crecimiento saprófito valiéndose de su enzima lacasa, y fenoloxidasa que produce melanina proporcionándole tolerancia a los cambios de temperatura (Illnait Zaragozí, 2012; Lazera, 2000; Quintero et al., 2005) facilitando la propagación y clonalidad de las basidiosporas o levaduras fúngicas. Sin embargo otros estudios respaldan que la asociación con material vegetal es común para las dos especies, teniendo en cuenta que la actividad de la lacasa, o fenoloxidasa, facilita la conversión de los compuestos difenólicos a melanina, permitiéndole a *C.neoformans/C.gattii* desarrollarse en la madera en descomposición (Memorias INS, 2013).

Por el contrario investigaciones realizadas en Australia, Vancouver (Canadá), España, India, Brasil, Colombia (Castañeda et al., 2001; Colom et al., 2012; Costa et al., 2009; Ellis and Pfeiffer, 1990; Escandón et al., 2005; Grover et al., 2007; Kidd et al., 2004) entre otros países han logrado aislar la especie a partir de material vegetal, por lo que han concluido que existe una relación entre *C.gattii* y las distintas especies de árboles. Ésta especie ha ido aumentando en los últimos años no solo por los aislamientos hallados en el ambiente sino también por los reportes a nivel clínico.

8. CONCLUSIONES

- De un total de 1214 muestras vegetales procesadas se obtuvieron 17 muestras positivas correspondientes a 65 aislamientos ambientales.
- Se detectó la presencia de *C.neoformans* en el perímetro urbano de las cabeceras municipales de Bordo y Coconuco, respaldando los posibles casos clínicos presentados en estas zonas.
- Se observó que los aislamientos ambientales según los resultados arrojados por las pruebas bioquímicas y moleculares, correspondieron en un 100% a la var.*grubii*, serotipo A y patrón molecular VNI, siendo esta variedad la más cosmopolita.
- Las variables ambientales como la humedad relativa y la temperatura son influyentes en el desarrollo del hongo, especialmente en los meses de temporada de lluvias en la cual se recuperó en mayor proporción con respecto a la época seca, así como lo reportan varios estudios ecológicos.

9. RECOMENDACIONES

- Debido a la baja recuperación de aislamientos de *C. neoformans* en las especies vegetales arbóreas, se recomienda a posteriores investigaciones seguir realizando muestreos ambientales en los distintos lugares de las cabeceras municipales como Santander de Quilichao, Bordo, Cajibío, Tímbio, Silvia y Coconuco durante un periodo de tiempo prolongado con el fin de aislar el hongo y observar la transitoriedad del mismo.
- Para una mayor recuperación de *C. neoformans* en fuentes de tipo vegetal se aconseja realizar muestreos en árboles con materia en descomposición e igualmente en las oquedades.
- Además de tener en cuenta los factores ambientales del lugar, se recomienda registrar las variaciones climáticas en microhábitats (corteza, suelo, y oquedades) ya que podrían ser más favorables que las del medio ambiente externo, proporcionando a la levadura un hábitat más protegido.
- Se recomienda a futuros estudios tener en cuenta factores abióticos como radiación solar, precipitación y composición química del sustrato, así mismo los bióticos como hongos y bacterias, los cuales influyen en el aislamiento y distribución de las especies *C. neoformans*/*C. gattii*.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarado, E.V., 2008. Estudio de los factores de patogenicidad de *Cryptococcus gattii*. Tesis doctoral. Universidad Autonoma de Barcelona. : 1-140.
- Baró, M.T., 2002. Epidemiologia de la criptococosis en España. Caracterización de los aislados de *cryptococcus neoformans*, Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 1-123 pp.
- Bastidas, T.O.Z., Reyes, D.K.A. and Salazar, J.S.A., 2013. Criptococosis cerebral: Análisis de 12 casos y revisión de la literatura. *Revista Medicina*, 35(2): 104-122.
- Benham, R.W., 1935. Cryptococci—their identification by morphology and by serology. *Journal of Infectious Diseases*, 57(3): 255-274.
- Boekhout, T. et al., 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 147(4): 891-907.
- Bovers, M. et al., 2006. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast research*, 6(4): 599-607.
- Bovers, M. et al., 2008. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. *Emerging infectious diseases*, 14(7): 1105.
- Cabral Passoni, L.F., 1999. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. *Rev Iberoam Micol*, 16(6): 77-81.

- Calvo, B.M. et al., 2001. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6): 2348-2350.
- Calle, Z.M., Enrique, 2008. El roble morado o guayacán rosado: explosión de belleza en los paisajes ganaderos. 76- 87.
- Callejas, A., Ordonez, N., Rodriguez, M. and Castaneda, E., 1998. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Medical Mycology*, 36(5): 341-344.
- Canelo, C. et al., 1999. Determinación de la variedad de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con SIDA. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 16(1-2): 44-47.
- Casadevall, A., 2007. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews*, 21(4): 130-132.
- Casali, A. et al., 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul.
- Castañeda, A., Huérfano, S., Rodríguez, M.C. and Castañeda, E., 2001. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendros.: 70- 74.
- Castañeda, A.C.E., 2001. Aislamiento de especies de *Cryptococcus* asociadas con *Eucalyptus* en un parque de Bogotá *Biomedica*, 21(1): 75- 8.
- Castañón, L.R., 2013. Criptococosis. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

- Colom, M.F. et al., 2012. *Ceratonia siliqua* (carob) trees as natural habitat and source of infection by *Cryptococcus gattii* in the Mediterranean environment. *Medical Mycology*, 50(1): 67-73.
- Contreras, O.I., Aycardi Morinelli, M.P., Alarcón Furnieles, J.L. and Jaraba Ramos, A.M., 2011. Identificación presuntiva de *Cryptococcus gattii* aislado de *Terminalia catappa* en Montería, Córdoba, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 63(2): 117-122.
- Costa, S.d.P. et al., 2009. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4): 662-664.
- Datta, K. et al., 2009. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. *Emerging infectious diseases*, 15(8): 1185.
- Duarte, A., Ordóñez, N. and Castañeda, E., 1994. Asociación de levaduras del género *Cryptococcus* con especies de *Eucalyptus* en Santafé de Bogotá. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 36(2): 125-130.
- Ellis, D.H. and Pfeiffer, T.J., 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7): 1642-1644.
- Emmons, C.W., 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *Journal of bacteriology*, 62(6): 685.
- Escandón, P. et al., 2012. Criptococosis en Colombia: resultados de la encuesta nacional, 2006-2010. *Biomédica*, 32(3): 386-98.
- Escandón, P. et al., 2005. Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus* spp. en Colombia. *Biomédica*, 25(3): 390-7.

- Escandón, P.S., A; Firacative, C; Castañeda, E., 2010. Isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII, from *Corymbia ficifolia* detritus in Colombia. NCBI: 675- 678.
- Eslava, J.A., 1993. Climatología y diversidad climática de Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc, 18(71): 507-538.
- Evans, E.E., 1950. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. Journal of Immunology, 64(5): 423-30.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P. and Casadevall, A., 2000. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. Infection and Immunity, 68(7): 4225-4237.
- Firacative, C., Escandón, P., Torres, G. and Rodríguez, M.C., 2011. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. Biomedica, 31(1): 118-123.
- Francis, J.K., 1989. *Terminalia catappa* L. Indian almond, almendra. New Orleans: 541- 544.
- Fraser, J.A. et al., 2006. Yeast diversity sampling on the San Juan Islands reveals no evidence for the spread of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak to this locale. FEMS Yeast research, 6(4): 620-624.
- Gattii, F.a.E.R., 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. Ann. soc. belge Med. trop: 689- 694.
- Goulart, L.S., 2009. Genes diferencialmente expressos por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* durante a infecção de macrófagos.

- Granados, D. and Castañeda, E., 2005. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microbial ecology*, 49(2): 282-290.
- Granados, D.P. and Castañeda, E., 2006. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992–2004. *FEMS Yeast research*, 6(4): 636-644.
- Grover, N., Nawange, S.R., Naidu, J., Singh, S. and Sharma, A., 2007. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopathologia*, 164(4): 159-170.
- Halliday, C.L., & Carter, D. A. , 2003. Clonal Reproduction and Limited Dispersal in an Environmental Population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Isolates from Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2): 703–711.
- Hamasha, A.M.S., Yildiran, S.T., Gonlum, A., Saracli, M.A. and Doganci, L., 2004. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia*, 158(2): 195-199.
- Heitman, J., 2006. Sexual Reproduction and the Evolution of Microbial Pathogens. *Current Biology*, 16(17): R711-R725.
- Hoyos, F., 1992. *Arboles tropicales ornamentales*. Caracas, VE, Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. 134- 136.

- Huérfano, S., Cepero, M.C. and Castañeda, E., 2003. Caracterización fenotípica de aislamientos ambientales de *Cryptococcus neoformans*. *Biomédica*, 23(3): 328-40.
- Illnait Zaragoza, M.T., 2012. Caracterización genotípica y susceptibilidad a antifúngicos de aislamientos cubanos de *Cryptococcus*, Tesis doctoral. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, 1-163 pp.
- Kidd, S.H., F., Tschärke, R. L., Huynh, M., Bartlett, K. H., Fyfe, M., Meyer, W. , 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49): 17258–17263.
- Kwon-Chung, K., 1975. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, 67(6): 1197-1200.
- Kwon-Chung, K., BENNETT, J.E. and THEODORE, T.S., 1978. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov. serotype BC of *Cryptococcus neoformans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28(4): 616-620.
- Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I. and Bennett, J.E., 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology*, 15(3): 535-537.
- Latouche, G.N., Huynh, M., Sorrell, T.C. and Meyer, W., 2003. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. *Applied and environmental microbiology*, 69(4): 2080-2086.

- Lazera, M.S., Cavalcanti MA; Londero, AT; Trilles, L; Nishikawa, MM; Wanke B, 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. 38 (5): 379-83.
- Lizarazo, J. et al., 2007. Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica*, 27(1): 94-109.
- Malliaris et al, S.D., Steenbergen, J. N., & Casadevall, A., 2004. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Medical Mycology*, 42(2): 149-158.
- Memorias INS, C.m., 2013. El hábitat del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* en Colombia: una exploración relevante para la salud pública. *Biomedica*, 33(supl.2): 16-21.
- Meyer, W. et al., 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Medical Mycology*, 47(6): 561-570.
- Meyer, W., Castañeda, A., Jackson, S., Huynh, M. and Castañeda, E., 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging infectious diseases*, 9(2): 189.
- Meyer, W. et al., 1999. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, 20(8): 1790-1799.

- Mitchell, T.G. and Perfect, J.R., 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical microbiology reviews*, 8(4): 515-548.
- Morales, J.G., F.; Ramos, D, 2007. eucalipto, una especie polemica. *Universidad iberoamericana, Ciudad de mexico* 2(22): 1-2.
- Morera-López, Y. et al., 2005. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. *Mycopathologia*, 160(1): 9-14.
- Nawange, S. et al., 2006. Decayed wood inside hollow trunks of living trees of *Tamarindus indica*, *Syzygium cumini* and *Mangifera indica* as natural habitat of *Cryptococcus neoformans* and their serotypes in Jabalpur City of Central India. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 16(2): 63-71.
- Nishikawa, M.M. et al., 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1): 73-77.
- Olivares, L.C. et al., 2009. Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Medical Mycology*, 47(7): 713-721.
- Ordoñez, N.C., E., 1994. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. *Biomedica*, 14(3): 131-139.
- Pérez, C.J.E., 2003. LA CRIPTOCOCOSIS: DE ENFERMEDAD ESPORADICA A REEMERGENTE. *Biosalud*: 21-64.

- Poveda, G., 2004. La Hidroclimatología de Colombia; Una síntesis desde la escala interdecal hasta la escala diurna. *Revista Académica Colombiana de Ciencia*, 28(107): 201-222.
- Quintero, E., Castañeda, E. and Ruiz, A., 2005. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. *Revista iberoamericana de micología*, 22(2): 93-98.
- Randhawa, H. et al., 2008. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Medical Mycology*, 46(8): 823-833.
- Randhawa, H., Kowshik, T. and Khan, Z., 2003. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, 41(3): 199-209.
- Refojo et al, N., Perrotta, D; Brudny, M; R Abrantes; Hevia, AI; Davel,G 2009. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *NCBI*, 47 (2): 177-84.
- Ríos, Y.J.M., 2011. La Aeromicología y su importancia para la medicina. 24(2): 28-42.
- Rivas, F., De Martin, M. and Rojas, V., 1999. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de suelos en Panamá. *Rev. méd. Panamá*, 24(1): 4-6.
- Rojas, A., 2011. Flora Urbana del Área Metropolitana de Bucaramanga. Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga CDMB.

- Rosario, I., Acosta, B. and Colom, F., 2008. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. Revista iberoamericana de micología, 25(1): S13-S18.
- Sanfelice, F., 1894. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. Ann Igiene, 4: 463-495.
- Steenbergen et al, J.N.S., H. A.; Casadevall, A., 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. PNAS, vol. 98 no. 26: 15245–15250.
- Steenbergen, J., Nosanchuk, JD, Malliaris, SD, & Casadevall, A. , 2003. *Cryptococcus neoformans* Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host *Dictyostelium discoideum*. Infection and Immunity, 71 (9): 4862–4872.
- Tello, M., Gutierrez, E., Galarza, C., Ramos, W. and Ortega-Loayza, A.G., 2013. Criptococosis. Revista Médica de Risaralda, 19(2).
- Torres Rodríguez, G.E., 2010. Estudio de características genotípicas y fenotípicas entre aislamientos colombianos de *cryptococcus gattii* serotipo b–patrón vgii, procedentes de Cúcuta y aislamientos responsables de la epidemia en Vancouver, Canadá/Study of genotypic and phenotypic characteristics among *c. gattii* serotype b-molecular type vgii clinical isolates from Cúcuta, colombia and isolates responsible for the outbreak in Vancouver, Canada, Tesis maestria. Universidad Nacional de Colombia. , 1-176 pp.
- Vargas, B. and Molina, L., 2007. Árboles para Bucaramanga. REVISTA NODO, 1(2): 25-40.

Vargas, B. and Molina, L., 2010. Cinco árboles urbanos que causan daños severos en las ciudades. REVISTA NODO, 5(9): 115-126.

Verma, S., & Idnurm, A., 2013. The Uve1 Endonuclease Is Regulated by the White Collar Complex to Protect *Cryptococcus neoformans* from UV Damage. Plos Genetics, 9(9): 1-14.

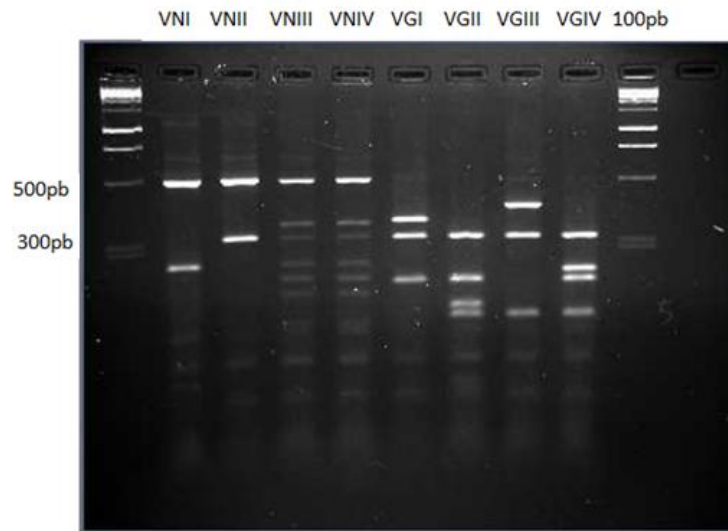
Wang, Y. and Casadevall, A., 1994. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. Applied and environmental microbiology, 60(10): 3864-3866.

Zaragoza, O. et al., 2009. Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. In: S.S. Allen I. Laskin and M.G. Geoffrey (Editors), Advances in Applied Microbiology. Academic Press, pp. 133-216.

www.broadinstitute.org/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/MultiHome.html.

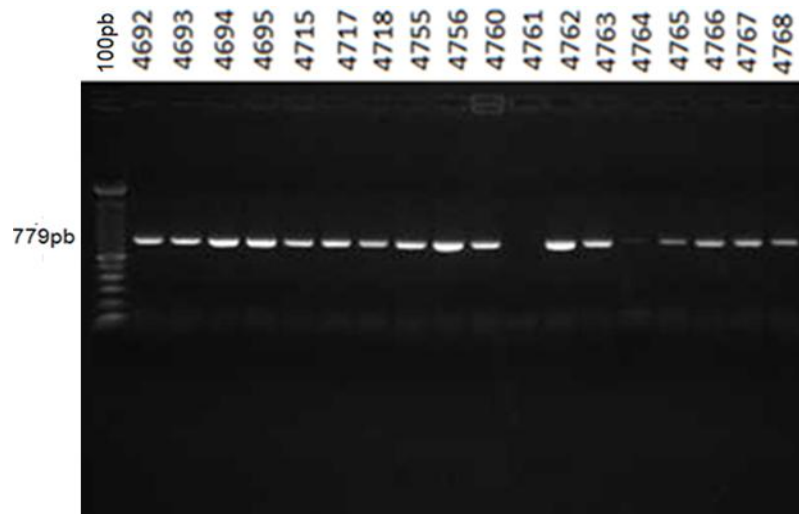
ANEXOS

Anexo A: Controles de RFLP con el gen URA5.



Carril 1 y 10: Marcador molecular de 100pb; carril 2-5 cepas estándar o controles VNI-VNIV y carril 6-9 VGI-VGIV.

Anexo B: Amplificación del gen URA5



Carril 1: marcador molecular de 100pb; carril 2-18 aislamientos ambientales generando un fragmento de 779pb.

Anexo C: Sitios de recuperación de *C. neoformans* en Bordo y Coconuco.

| Municipio | Coordenadas | Dirección | Nombre | % Colonias | Árbol |
|-----------|-----------------------------------|-------------|-------------------|------------|-----------|
| El Bordo | N 2° 06' 41,1" W 76° 59' 21,9" | Cra 8 N° 3 | B/Pablo VI bajo | 9.2% | Almendo |
| | N 2° 06' 40,6" W 76° 59' 21,8" | Cra 8 N° 3 | Centro Carcelario | 16.9% | |
| | N 2° 06' 44,4" W 76° 59' 10,6" | Cra 5 N° 3a | Estación Policia | 1.5% | |
| Coconuco | N 2° 20' 51,2" W 76° 29' 58,5" | Cra 1 N° 7a | Parque principal | 4.6% | Pino |
| | N 2° 20' 27,1" W 76° 29' 49,5" | — | Loma | 70.7% | Eucalipto |

Anexo D: Pisos térmicos según Método de Caldas

MÉTODO DE CALDAS

El sistema de los pisos térmicos de Caldas es uno de los métodos que se han intentado aplicar en Colombia y se basa en razones de altimetría:

- Cálido. Desde el nivel del mar hasta los 1.000 metros de altitud; se permite un margen de 400 metros a la cota superior, según condiciones locales; temperatura media superior a 24°C
- Templado. Entre 1000 y 2000 metro de altitud; margen de 500 metros de fluctuación en cualquiera de sus límites; temperatura media no inferior a 17.5°C
- Frío. Entre 2000 y 3000 metros de altitud; margen de 400 metros de fluctuación entre tales límites; temperatura media no inferior a 12°C
- Paramuno bajo. Entre 3200 y 3700 metros de altitud; temperatura medias entre 12°C y 7°C
- Paramuno alto. Más de 3700 metros de altitud hasta la línea de nieves perpetuas; temperaturas medias menores de 7°C
- Nieves perpetuas. Es visible sin esfuerzo alguno que la principal limitación del sistema de Caldas consiste en utilizar solamente un elemento: el energético (expresado como altitud en este caso).

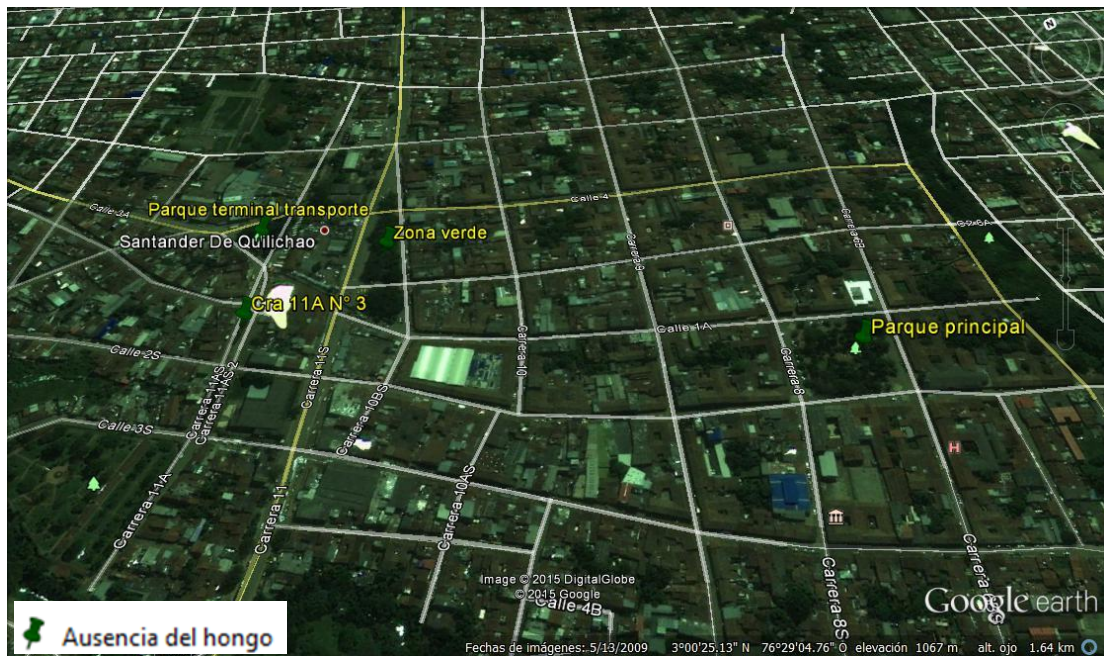
Otra limitación del método es el rango entre un piso y otra es que son probablemente amplios.

Anexo E: Lugares muestreados en Bordo



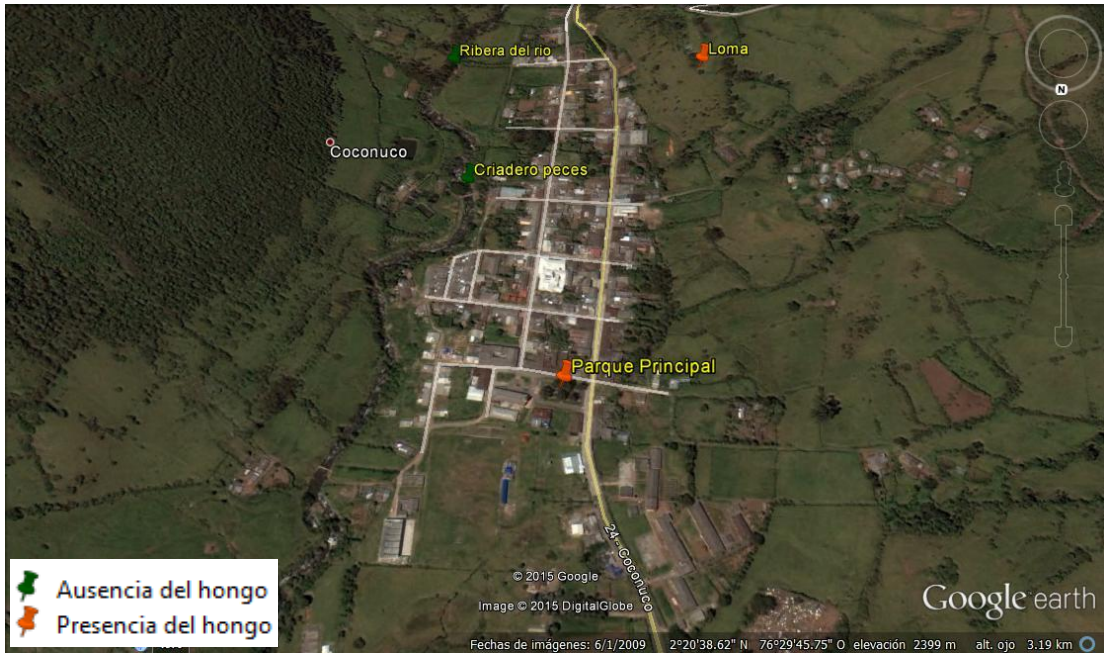
Fuente: Image ©2015 GoogleGlobe

Anexo F: Lugares muestreados en Santander de Quilichao



Fuente: Image ©2015 GoogleGlobe

Anexo G: Lugares muestreados en Coconuco



Fuente: Image ©2015 GoogleGlobe

Anexo H: Lugares muestreados en Silvia



Fuente: Image ©2015 GoogleGlobe

Anexo I: Lugares muestreados en Cajibío



Fuente: Image ©2015 GoogleGlobe

Anexo J: Lugares de muestreados en Tímbio



Fuente: Image ©2015 GoogleGlobe

Anexo k: Inventario especies de árboles

| Timbio | |
|--------------------------------|-------------------|
| Especie | Nombre común |
| <i>Tabebuia chrysanthus</i> | guayacan amarillo |
| <i>Liquidambar styraciflua</i> | estoraque |
| <i>Spathodea campanulata</i> | túlipan Africano |
| <i>Mangifera indica</i> | mango |
| <i>Calliandra purdiei</i> | carbonero |
| <i>Myrcia cf. popayanensis</i> | arrayan |
| <i>Nerium oleander</i> | adelfa |
| <i>Ficus jamesiana</i> | matapalo |
| <i>Eucalyptus grandis</i> | eucalipto |
| <i>Quercus humboldtii</i> | roble |
| <i>Fraxinus chinensis</i> | urapán |
| <i>Eucalyptus globulus</i> | eucalipto |
| <i>Pinus sp.</i> | pino |
| <i>Enterolobium sp.</i> | |
| <i>Senna sp.</i> | |
| <i>Callistemon sp.</i> | |
| <i>Araucaria sp.</i> | |
| Coconuco | |
| Especie | Nombre común |
| <i>Cupressus sempervirens</i> | cipres |
| <i>Eucalyptus grandis</i> | eucalipto |
| <i>Alnus acuminata</i> | aliso |
| <i>Pinus sp.</i> | pino |

| Cajibío | |
|--------------------------------|-------------------|
| Especie | Nombre común |
| <i>Myrcia cf. popayanensis</i> | arrayan |
| <i>Tabebuia chrysanthus</i> | guayacan amarillo |
| <i>Ochroma pyramidale</i> | balso |
| <i>Quercus humboldtii</i> | roble |
| <i>Erythrina japonica</i> | nispero |
| <i>Ficus andicola</i> | caucho sabanero |
| <i>Eucalyptus grandis</i> | eucalipto |
| <i>Fraxinus chinensis</i> | urapan |
| <i>Ficus lyrata</i> | figueroa |
| <i>Pinus sp.</i> | pino |
| <i>Trichanthera gigantea</i> | nacedero |

| Santander de Quilichao | |
|------------------------------|-------------------|
| Especie | Nombre común |
| <i>Tabebuia rosea</i> | guayacan rosado |
| <i>Mangifera indica</i> | mango |
| <i>Ficus benjamina</i> | matapab |
| <i>Calliandra purdiei</i> | carbonero |
| <i>Cananga odorata</i> | ylan ylan |
| <i>Brownea grandiceps</i> | rosa de montaña |
| <i>Cassia fistula</i> | lluvia de oro |
| <i>Ceiba pentandra</i> | ceiba |
| <i>Ficus elástica</i> | caucho |
| <i>Senna sp.</i> | |
| <i>Calliandra sp.</i> | |
| Bordo | |
| Especie | Nombre común |
| <i>Tabebuia chrysanthus</i> | guayacan amarillo |
| <i>Tabebuia rosea</i> | guayacan rosado |
| <i>Spathodea campanulata</i> | túlipan Africano |
| <i>Pachira speciosa</i> | cacao Africano |
| <i>Bauhinia monandra</i> | pata de buey |
| <i>Cassia siamea</i> | acacia amarilla |
| <i>Cananga odorata</i> | ylan ylan |
| <i>Ficus benjamina</i> | matapab |
| <i>Cassia fistula</i> | lluvia de oro |
| <i>Terminalia catappa</i> | almendro |

| Silvia | |
|--------------------------------|-------------------|
| Especie | Nombre común |
| <i>Tabebuia chrysanthus</i> | guayacan amarillo |
| <i>Delostoma integrifolium</i> | yalóman |
| <i>Erythrina rubrinervia</i> | chocho |
| <i>Eucalyptus grandis</i> | eucalipto |
| <i>Cupressus sempervirens</i> | cipres |
| <i>Eucalyptus globulus</i> | eucalipto |
| <i>Pinus sp.</i> | pino |

Anexo L: Código aislamientos ambientales de *C.neoformans* registrados en el cepario del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

| | | |
|---------------|---------------|---------------|
| H0058-I- 4692 | H0058-I- 4767 | H0058-I- 4830 |
| H0058-I- 4693 | H0058-I- 4768 | H0058-I- 4831 |
| H0058-I- 4694 | H0058-I- 4769 | H0058-I- 4846 |
| H0058-I- 4695 | H0058-I- 4803 | H0058-I- 4847 |
| H0058-I- 4696 | H0058-I- 4804 | H0058-I- 4848 |
| H0058-I- 4715 | H0058-I- 4805 | H0058-I- 4849 |
| H0058-I- 4716 | H0058-I- 4806 | H0058-I- 4850 |
| H0058-I- 4717 | H0058-I- 4807 | H0058-I- 4851 |
| H0058-I- 4718 | H0058-I- 4808 | H0058-I- 4852 |
| H0058-I- 4719 | H0058-I- 4809 | H0058-I- 4853 |
| H0058-I- 4755 | H0058-I- 4810 | H0058-I- 4854 |
| H0058-I- 4756 | H0058-I- 4811 | H0058-I- 4855 |
| H0058-I- 4757 | H0058-I- 4812 | H0058-I- 4856 |
| H0058-I- 4758 | H0058-I- 4818 | H0058-I- 4857 |
| H0058-I- 4759 | H0058-I- 4819 | H0058-I- 4858 |
| H0058-I- 4760 | H0058-I- 4820 | H0058-I- 4859 |
| H0058-I- 4761 | H0058-I- 4821 | H0058-I- 4860 |
| H0058-I- 4762 | H0058-I- 4822 | H0058-I- 4861 |
| H0058-I- 4763 | H0058-I- 4823 | H0058-I- 4862 |
| H0058-I- 4764 | H0058-I- 4824 | H0058-I- 4863 |
| H0058-I- 4765 | H0058-I- 4825 | H0058-I- 4864 |
| H0058-I- 4766 | H0058-I- 4829 | |