

**BUSQUEDA DEL COMPLEJO *Cryptococcus neoformans* /*Cryptococcus gattii*
EN ESPECIES VEGETALES DE LA ZONA URBANA DE LA CIUDAD DE
POPAYÁN, CAUCA.**

LEISLY KATHERIN RUIZ MONTOYA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
PROGRAMA DE BIOLOGIA
POPAYAN
2013**

BUSQUEDA DEL COMPLEJO *Cryptococcus neoformans* /*Cryptococcus gattii* EN ESPECIES VEGETALES DE LA ZONA URBANA DE LA CIUDAD DE POPAYÁN, CAUCA.

LEISLY KATHERIN RUIZ MONTOYA

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Directora:

FABIOLA E. GONZALEZ C.

Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología

Codirector:

LUIS REYNEL VASQUEZ A.

Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología

Asesoras:

PATRICIA ESCANDON

Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud

GISELLE ZAMBRANO

Departamento de Biología

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
PROGRAMA DE BIOLOGIA
POPAYAN
2013**

CONTENIDO

1.	TABLA DE FIGURAS	5
2.	AGRADECIMIENTOS	6
3.	RESUMEN	7
4.	INTRODUCCION.....	8
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
6.	JUSTIFICACIÓN.....	12
7.	MARCO TEÓRICO.....	15
7.1	Historia.....	15
7.2	Características.....	16
7.3	Epidemiología.....	17
7.4	Serotipos.....	18
7.5	Enfermedad-diagnóstico	18
7.6	Cultivo:.....	19
7.7	Tipificación molecular del complejo <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	20
7.7.1	PCR huella digital	20
7.7.2	Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).....	21
7.8	Ecología	22
7.8.1	Eucalipto (<i>Eucalyptus</i> sp.).....	23
7.8.2	Tulipán africano (<i>Spathodea campanulata</i>).....	23
7.8.3	Guayacán amarillo (<i>Tabebuia chrysanta</i>) y Guayacán rosado (<i>Tabebuia rosea</i>).....	23
7.8.4	Acacia forrajera (<i>Leucaena</i> sp.)	24
7.8.5	Caucho sabanero (<i>Ficus benjamina</i>).....	24
8.	ANTECEDENTES	25
9.	OBJETIVOS.....	28
9.1	Objetivo general:	28
9.2	Objetivos específicos:	28

10. METODOLOGÍA.....	29
10.1 Área de estudio.	29
10.2 Zonas de muestreo.....	30
10.3 Especies vegetales muestreadas.....	31
10.4 Intensidad de muestreo.	31
10.6 Procesamiento de las muestras.....	33
10.7 Identificación por pruebas convencionales.	33
10.8 Medio agar bifenil-semilla para ave (<i>Guizotia abyssinica</i>).	34
10.9 Determinación del patrón molecular.....	34
10.9.1 Extracción de ADN de alto peso molecular:	34
10.9.2 Amplificación del gen orotidin monofosfato pirofosforilasa (OMPasa) llamado también <i>URA5</i> :.....	35
10.9.3 PCR huella digital del ADN con el iniciador (GTG) ₅ :.....	36
10.10 Instrumento Estructurado:	36
10.11 Análisis de datos:.....	37
11. RESULTADOS	38
11.1 Recolección de muestras:	38
11.2 Aislamientos del complejo	40
11.3 Pruebas bioquímicas:	41
11.4 Tipificación molecular:	43
12. DISCUSIÓN	49
13. CONCLUSIONES	53
14. RECOMENDACIONES	54
15. BIBLIOGRAFIA	55
16. ANEXOS.....	62

1. TABLA DE FIGURAS

Foto 1: área de estudio

Foto 2: Mapa de zonas de muestreo

Foto 3: Prueba de ureasa

Foto 4: Prueba de CGB.

Foto 5: Prueba de fenol-oxidasa.

Foto 6: Pruebas bioquímicas.

Foto 7-10: PCR huella digital.

Foto 11: PCR gen *URA5*.

Foto 12-13: Restricción del gen *URA5*.

Tabla 1: Muestras Ambientales Recolectadas.

Tabla 2: Aislamientos positivos

Tabla 3: Código de los aislamientos ambientales en el Instituto Nacional de salud.

2. AGRADECIMIENTOS

- Agradecerle a Dios, por bendecirme y permitirme llegar a la culminación de esta meta.
- Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología “Francisco José de caldas” (Colciencias), por la financiación del proyecto, código: Colciencias 20113600115383.
- A Rosi Mary Ruiz Montoya, por su incansable apoyo y ejemplo de perseverancia y constancia.
- A mi directora Fabiola Gonzales y a mi codirector Luis Reinel Vásquez, por su esfuerzo, dedicación y paciencia al ser mis guías en la realización de este trabajo
- Al grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, especialmente a la doctora Patricia Escandón, por permitirme reforzar mis conocimientos en esta área de investigación.
- A Jhon Carlos Meléndez, por su apoyo y colaboración.
- A mis compañeros y amigos, por estar a mi lado durante mi formación profesional y sus buenos deseos para la culminación de este trabajo.
- A María Fernanda Mesias del L. M. y al laboratorio unificado de la universidad del cauca, por su colaboración y prestación de servicios.
- A Cristian Anacona y Fabián Ledezma por su apoyo en la elaboración de este trabajo.

3. RESUMEN

El propósito de este trabajo fue determinar la presencia y distribución del complejo *Cryptococcus neoformans* /*Cryptococcus gattii* en el perímetro urbano de la ciudad de Popayán, en especies vegetales como Eucalipto (*Eucalyptus* sp.), Guayacán (*Tabebuia* sp.), Tulipán africano (*Sphatodea campanulata*), Acacia (*Leucaena* sp.) y Caucho (*Ficus* sp.), las cuales se encuentran distribuidas en diferentes zonas de la ciudad.

Durante los meses de septiembre de 2012 y febrero de 2013 se obtuvieron un total de 339 muestras a partir de 112 árboles de diferente material vegetal provenientes de 19 sitios; las cuales se procesaron para aislar el complejo *C. neoformans*/*C. gattii* usando el método convencional de extracción y siembra en medio selectivo, se determinó el patrón molecular de los aislamientos por medio de PCR huella digital (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RFLP del gen URA5 (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), así como la asociación con las variables ambientales.

Se logró recuperar 47 aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii* correspondiente a un 13.58% de las muestras colectadas. Todas las muestras positivas se recuperaron a una temperatura y humedad promedio de 17.31°C y 67.62% respectivamente y todos los aislamientos pertenecieron al patrón molecular VNI, serotipo A. En conclusión el complejo *Cryptococcus neoformans* /*Cryptococcus gattii* se aisló en 2 de los 19 sitios muestreados, sin una relación particular con las variables ambientales ni con el tipo de material colectado.

4. INTRODUCCION

La Criptococosis es una micosis oportunista causada por una levadura encapsulada perteneciente al complejo *Cryptococcus neoformans/ Cryptococcus gattii* y cuyos casos de infección ha aumentado con el número de pacientes con sida (Castañeda 2001; Bustamante 1998, Escandon et al, 2012). Este hongo presenta dos especies patógenas para los seres humanos y cinco serotipos: *C. neoformans* con los serotipos A, D y AD y *C. gattii* con los serotipos B y C, observaciones han demostrado que la preferencia de las variedades por sus hospederos dependen de su estado inmune, así como el curso de la enfermedad. (Lizarazo 2000; Castañeda 2001; Quintero 2005).

La morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocompetentes es causada por *C. gattii* (Escandón, 2005). Se sabe que *C. neoformans* afecta más frecuentemente a pacientes inmunosuprimidos como por ejemplo con leucemia, linfomas, sarcoidosis, lupus eritomatoso sistémico, sin embargo, la población más susceptible es la infectada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Por otro lado, *C. gattii* afecta a los pacientes inmunocompetentes causando pérdida de la visión, complicación infrecuente en *C. neoformans* (Escandón et al, 2012; Lizarazo, 2000; Martin, 1999).

C. gattii es una levadura saprofítica, que puede llegar a comprometer seriamente a pacientes inmunocompetentes; siendo los eucaliptos su hábitat primario y estudios han demostrado que la madera en descomposición puede servir como sustrato para el hongo.

Debido a su importancia a nivel clínico, se han desarrollado estudios epidemiológicos y genéticos del complejo *C. neoformans/ C. gattii* mediante diferentes técnicas moleculares: la cario-tipificación, ampliación de ADN polimórfico, Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP),

estudios de hibridación de ADN, Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y Tipificación de secuencias de multilocus (MLST) (Escandón, 2010; Castañeda, 2004; Meyer, 2003).

Debido a las consideraciones anteriores, el propósito de este trabajo es determinar la presencia y distribución del complejo *C. neoformans/ C. gattii* en la ciudad de Popayán, y de esta manera determinar los posibles focos de infección del hongo, aportando al conocimiento de la epidemiología de la Criptococosis en la zona y algunas causas de su propagación.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El complejo *C. neoformans* /*C. gattii* en la actualidad se considera un hongo con virulencia intrínseca o endémico, afectando a pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos, causando variabilidad de cuadros clínicos desde enfermedad pulmonar y meningitis hasta ceguera. La Criptococosis, es una infección que afecta principalmente el sistema nervioso central y ha tomado gran importancia debido a la epidemia del sida, la cual, últimamente ha marcado el estudio de la ecología y epidemiología de este hongo.

A nivel mundial, la mayoría de los aislados obtenidos de pacientes con sida pertenecen al genotipo VNI (Meyer, 2003). Los brotes y los nichos ambientes de *C. gattii* continúan surgiendo, y los estudios de este organismo siguen siendo fascinantes desde los diferentes enfoques de estudio: su relación con el medio ambiente, su diversidad genética, su epidemiología, la incubación y las predicciones de riesgo. (Bartlett, 2012). En trabajos realizados se ha comprobado que *C. gattii* presenta una cepa más virulenta denominada VGIIc, la cual puede ocasionar hasta 20% de las muertes, éste se ha aislado en Estados Unidos (Washington y Oregon), así como en Brasil (Bonifaz, 2012). A nivel nacional, se encuentra que el patrón molecular más frecuente es el genotipo VNI para *C. neoformas* y VGIII para *C. gattii* (Fircative *et al.*, 2011).

La Criptococosis tiene incidencias anuales de 66 y 8.5 casos por cada mil personas con VIH, en Estados Unidos e Italia respectivamente (Mirza *et al.*, 2003; FIMUA, 2002). En Colombia de 23% de los reportes de pacientes con VIH, estaban infectados con Criptococosis (Escandón *et al.*, 2012). Y en departamento del Cauca se han registrado 23 casos de Criptococosis, según los datos de la Secretaria Departamental de Salud y la Facultad de Ciencias de la Salud (Comunicación personal secretaria departamental de salud).

Debido a que hay casos registrados de Criptococosis en el departamento del Cauca, como se mencionó anteriormente, y no existe información suficiente su causa directa y su epidemiología, es necesario saber dónde podrían estar ubicados los posibles focos de infección por *C. neoformans* / *C. gattii* en la zona urbana de Popayán y los serotipos infectantes encontrados.

6. JUSTIFICACIÓN

El complejo *C. neoformans/C. gattii* es el agente etiológico causante de la Criptococosis que es una infección exógena, sub-aguda o crónica, que afecta principalmente pulmones y sistema nervioso central (Alvarado, 2008). La incidencia de la infección ha aumentado con la epidemia del sida. La patología ocasionada por *C. gattii* está restringida a regiones tropicales y subtropicales debido a la distribución del hongo, pero se han encontrado brotes de la enfermedad en la isla de Vancouver demostrando la plasticidad de adaptación que presenta *C. gattii* (Bartlett, 2012; Martín *et al.*, 1999).

A nivel mundial, en Estados Unidos se registraron incidencias anuales de 66 personas por cada mil con VIH, y en Italia se reportaron 8.5 casos por cada mil personas con el virus, cuyo agente inféctate fue principalmente *C. neoformans*. (Mirza *et al.*, 2003; FIMUA, 2002). En Colombia desde 1997 se viene realizando una Encuesta Nacional con el objetivo de obtener un estimativo acerca de la situación de la criptococosis en el país. El factor de riesgo prevalente fue la infección por VIH (83,5%), y la Criptococosis definió el sida en 23% de los casos. De 413 aislamientos recuperados, 95,6% fueron *C. neoformans* var. *grubii*, 1% var. *neoformans*, y 3,4% *C. gattii* (Escandón, 2012). A nivel local, en el departamento del Cauca, según los datos del laboratorio de la secretaria departamental de salud, entre los años 2001-2012, se han reportado 23 casos de criptococosis. En el laboratorio de micología de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca, en los últimos 10 años, se reportan 21 casos positivos para *C. neoformans* var. *grubii*; un caso para *C. laurentii* y un caso para *C. gattii*, aislado de una persona inmunocompetente (Comunicación personal Secretaria Departamental de Salud).

Debido a que el complejo *C. neoformans/C. gattii* tiene como nicho ecológico excretas de aves y detritos de árboles como los eucalipto y almendro. En este estudio se plantea la necesidad de hacer una búsqueda ambiental en de complejo en especies vegetales en la zona urbana de la ciudad de Popayán, para localizar los puntos críticos y los posibles focos de infección del hongo. También se realizará una caracterización molecular, para establecer los patrones moleculares que circulan en la zona, contribuyendo no sólo, en el campo de la investigación, sino también trascendiendo al ámbito académico y social.

A nivel investigativo, la realización de este estudio proporcionará información acerca del estado ambiental y distribución parcial de *C. neoformans/ C. gattii* en la ciudad de Popayán. Lo anterior podría generar conciencia acerca de la necesidad de investigar sobre esta levadura, aportando así a ciencias como la Biología, la Medicina, Enfermería y afines.

En el ámbito social, esta investigación proveerá información acerca del impacto que tiene *C. neoformans /C. gattii* sobre la salud de quienes estén en contacto con los posibles lugares de propagación de éste. Además podría contribuir a que se tomen medidas de precaución para proteger a la población de los daños que ocasiona esta levadura.

Finalmente, a nivel académico, este estudio proporcionará al programa de Biología de la Universidad del Cauca, un nuevo tópico de investigación para que futuros biólogos, contribuyan con estudios que permitan enriquecer los conocimientos sobre *C. neoformans /C. gattii* y sus implicaciones sobre la salud de la población Payanesa.

Esta investigación está enmarcada dentro de un proyecto nacional financiado por Colciencias denominado: predicción de las posibles áreas endémicas para *C. neoformans /C. gattii* en Colombia: modelo ecológico de áreas de riesgo, cuyo

objetivo es delimitar las áreas geográficas donde está establecido actualmente el complejo *C. neoformans* / *C. gattii* y predecir a que lugares el hongo se puede dispersar en un futuro.

MARCO TEÓRICO

7.1 Historia

Los hongos son eucariotas desprovistos de clorofila, no fotosintéticos, que presentan diferencias netas en cuanto a la estructura de la pared celular (polímeros de glucosa o manosa), características de desarrollo (cultivo en medios ácidos, desarrollo lento en forma de micelio o de levadura), sensibilidad a quimioterápicos (que son específicos y en general tóxicos para el hombre) y existencia de mecanismos particulares de reproducción (esporas) (Pumarola *et al.*, 2ª edición, 1998).

Los hongos unicelulares o “levaduras” presentan una forma oval (5-30 micras), son inmóviles y se dividen por mecanismos diversos, especialmente por gemación. Deben considerarse como hongos que han perdido su forma filamentosa y se han convertido en organismos unicelulares, que en algunos casos se reconocen por la presencia de mecanismos de reproducción sexual (Pumarola *et al.*, 2ª edición, 1998).

C. neoformans fue aislado por primera vez por el científico F. Sanfelice a partir de jugo de melocotón fermentado y fue nombrado en ese momento como *Saccharomyces neoformans*. Al mismo tiempo en Alemania los científicos Otto Busse (1894) y Abraham Buschke (1895), notificaron separadamente una levadura con características similares a la de una lesión de tipo sarcomatoso de un paciente de sexo femenino, la paciente murió de una enfermedad diseminada y este hongo fue denominado *Saccharomyces hominis*. En 1901, Vuillemin determinó que este hongo no fermentaba los azúcares y tampoco presentaba las típicas ascosporas del género *Saccharomyces*, así que reclasificó a esta levadura en el género *Cryptococcus*. De esta manera, el primer aislado clínico de Busse fue nombrado como *C. hominis* y *C. neoformans* para el aislamiento de Sanfelice (Baró, 2002; Alvarado, 2008; Arredondo, 2006).

En 1970, F. Gatti, aisló del líquido cefalorraquídeo de un niño con meningitis una variedad de *Cryptococcus*, la que fue llamada por Vanbreuseghem (1970) como *C. neoformans* var. *gattii* ya que presentaba características diferentes a las de *C. neoformans*. En 1990, los autores australianos Ellis y Pfeiffer, propusieron que el nicho ecológico de *C. neoformans* var. *gattii* estaba asociado con especies vegetales como el eucalipto (*E. camaldulensis* y *E. tereticornis*), mientras que *C. neoformans* estaba relacionado con excretas de palomas (*Columba livia*) principalmente, ya que es un ambiente desfavorable para otro tipo de microorganismos (Baró, 2002; Arredondo, 2006). A partir del año 2000, *C. gattii* empezó a ser estudiada como especie separada y no como una variedad de *C. neoformans* (Alvarado, 2008).

7.2 Características

C. gattii es una levadura saprofitica que puede llegar a comprometer seriamente a pacientes inmunocompetentes, siendo los eucaliptos su hábitat primario; sin embargo, estudios han demostrado que la madera en descomposición pueden servir como sustrato para el hongo. Es un basidiomiceto, denominado *Filobasidiella bacillospora* (Kwon-Chung, 1976), se reproduce de forma sexual, se caracteriza por la presencia de basidiosporas más alargadas y baciliformes con gemación unipolar o multipolar, encapsulado, de unas 3 a 7 micras de diámetro (Arredondo, 2006; Escandón, 2005).

Las cepas de *C. gattii* y *C. neoformans* presentan una capsula mucopolisacarida que le confiere aspecto macroscópico, mucoide, color blanco amarillento en las colonias crecidas en medios de cultivos convencionales en micología. El tamaño de la cápsula en el paciente infectado puede llegar a medir un diámetro mayor que el de la propia levadura (3.5-7 x 3.7-8 micras); pero a medida que se realizan cultivos consecutivos, la capsula puede llegar a reducirse o incluso perderse. La cápsula no se tiñe con colorantes convencionales como Gram o Giemsa, se ve por

contraste negativo como un espacio claro alrededor de la célula, el método más convencional utilizado es el de tinta china que genera un contraste que permite la visualización de la célula y la cápsula (Baró, 2002; Arredondo, 2006).

Las cepas de *C. neoformans* y *C. gattii* son sensibles a la ciclohexamida por lo tanto los medios de cultivo empleados para su crecimiento deben estar exentos de esta sustancia; producen la enzima ureasa que hidroliza la urea, convirtiéndola en amoníaco, resultando positiva, después de 15 minutos en pruebas rápidas, a diferencia de otras levaduras (Arredondo, 2006; Baró, 2002)

Cryptococcus es productor también de melanina, la cual puede ser detectado en medios de cultivo como el medio Staib o de semilla de niger (*Guizotia abyssinica*) en los cuales genera pigmentos café marrón, debido a que transforma el ácido cafeico con alto contenido de dihidroxi-fenilalanina o DOPA que contiene la semilla, en un compuesto polimérico de estructura química similar a la melanina (Kwon-Chung, 1987)

7.3 Epidemiología

C. neoformans, seguido de *C. gattii*, originan enfermedades respiratorias y meningoencefalitis, potencialmente fatales tanto en humanos como en animales. La Criptococosis humana se desarrolla luego de efectuarse la exposición ambiental y la inhalación de las levaduras (Nardelli, 2005).

Antes de la epidemia del sida, la criptococosis ocurría esporádicamente tanto en hombres como en animales en cualquier parte del mundo. En la década de 1980 por la aparición de la inmunodeficiencia causada por el VIH, se produjo un incremento significativo en el número de casos de Criptococosis reportados en este tipo de pacientes (Baró, 2002; Arredondo, 2006).

La patología generada por *C. gattii* es similar a la de otros hongos patógenos primarios, afectando a pacientes inmunocompetentes (Alvarado, 2008). La principal complicación que genera *C. gattii* a diferencia de *C. neoformans* es la pérdida gradual de la visión ocasionada por la obstrucción del nervio óptico (Lizarazo, 2000).

Se han encontrado diferencias en la distribución geográfica de las 2 especies. *C. neoformans* es cosmopolita, mientras que *C. gattii* está restringido a regiones tropicales y subtropicales, entre las cuales se encuentran Australia, Brasil, Camboya, Hawaii, Sur de California, México, Paraguay, Tailandia, Vietnam, Nepal, Colombia y África Central (Mak, 2010). En estas áreas, *C. gattii* puede representar más del 35% de las cepas aisladas (Nardelli, 2005), también se pudo aislar *C. gattii* de los suelos dentro del rango de pH de 4,33-7,48, donde se asocia su presencia con menor contenido de humedad y menor contenido de carbono orgánico (Mak, 2010).

7.4 Serotipos

Se considera que existen al menos dos especies patógenas de *Cryptococcus* y cinco serotipos causantes de la criptococosis (Alvarado, 2006). Entre ellas se encuentra *C. neoformans* con dos variedades: var. *grubii* (serotipo A) y var. *neoformans* (serotipo D) y el serotipo AD considerado como un híbrido (Escandón, 2005). Y *C. gattii* con los serotipos B y C (Baró, 2002).

7.5 Enfermedad-diagnóstico

La Criptococosis es una micosis sistémica producida por un hongo levaduriforme encapsulado (Martin-Mazuelos *et al.*, 1999), puede afectar tracto respiratorio, la piel o al sistema nervioso central, tanto de animales como de humanos, no se encuentra entre las consideradas “Enfermedades de Declaración Obligatoria”, pero sí de vigilancia pasiva por el laboratorio. La infección pulmonar en el hombre

puede ser asintomática o presentar signos inespecíficos como: tos, disnea, fiebre, dolor pleural, etc. La mayoría de reportes de casos pulmonares son ocasionados por *C. gattii*, causando criptococomas, que son masas fúngicas cuyo progreso es grave llevando al paciente a coma, paro respiratorio y muerte (Bonifaz, 2012). La infección cutánea en el hombre se caracteriza por la formación de pápulas, pústulas o abscesos con ulceración posterior (Lizarazo, 2007).

La meningitis criptocócica es la forma de presentación más frecuente, constituyendo la máxima expresión del neurotropismo del hongo. Una de las razones aducidas para explicarlo, hace referencia a una ausencia de factores inhibidores del crecimiento en el líquido cefalorraquídeo (LCR), mientras que un segundo argumento, supone la existencia en el tejido nervioso de factores nutricionales selectivos, tales como asparagina, que pueden funcionar como fuente de nitrógeno para la levadura (Alvarado, 2008).

En el diagnóstico se trata de poner en evidencia la levadura por examen directo por exclusión de tinta china, estudio histológico, aislamiento por cultivo del hongo o por detección de antígeno capsular en muestras clínicas (Baró, 2002).

7.6 Cultivo:

Para el aislamiento de la levadura por medio de la sangre, el esputo o el líquido cefalorraquídeo, se realiza por cultivo preferencial en agar sabouraud con antibacterianos (Baró, 2002; Nardelli, 2005).

Es útil la utilización al mismo tiempo del medio de cultivo agar *Guizotia abyssinica*, que permite la detección de melanina, incubando a 37°C y 28°C, la levadura generalmente crece a las 72 horas, desarrollando colonias de consistencia cremosa de color marrón oscuro en este medio.

Para la identificación específica de *C. gattii* se utiliza el medio canavanina-glicina-azul de bromotimol, ya que esta especie asimila la glicina y es resistente a la canavanina, generándose un cambio de color en el medio, pasando de verde a azul, cambio que no sucede en *C. neoformans* ya que no asimila la glicina (Kwon.Chung, 1987).

7.7 Tipificación molecular del complejo *C. neoformans* / *C. gattii*

Actualmente, es aceptado que *C. gattii* puede subdividirse en al menos cuatro diferentes tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII y VGIV, y que *C. neoformans* puede subdividirse en cuatro tipos moleculares principales: VNI (var. *grubii*, serotipo A), VNII (var. *grubii*, serotipo A), VNIII (serotipo AD), VNIV (var. *neoformans*, serotipo D), los cuales pueden distinguirse utilizando diversas técnicas genéticas, incluyendo Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen URA5, Tipificación de la Secuencia del Locus Múltiple (MLST), y PCR huella digital (Harris, 2012; Meyer, 2003).

7.7.1 PCR huella digital

En 1985, K. Mullis, un investigador de la Corporación Cetus, inventó un método para lograr la multiplicación in vitro de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Este método revolucionaría en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico. Se trata de la reacción en cadena de la polimerasa, ya muy conocida como PCR, siglas provenientes del inglés Polymerase Chain Reaction. Esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento

de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas.

La PCR es un proceso que consta de tres fases:

- La primera reacción consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno (95°C).
- La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los *primers* a las cadenas (70-50°C).
- La tercera reacción la extensión se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde (Cortazar *et al.*, 2004).

7.7.2 Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

La técnica de RFLPs (Restriction Fragments of Length Polymorphism) permite detectar diferencias entre genomas de distintos organismos con base en la pérdida o ganancia de sitios de restricción (secuencias específicas que son reconocidas por endonucleasas de restricción). Existen varios protocolos, todos tienen como objetivo identificar la variación en tamaño de los fragmentos que permitan diferenciar a las entidades de estudio (individuos, poblaciones, especies, y *taxa* supra-específicos).

Posterior al desarrollo de la PCR es posible dirigir los análisis de RFLP's hacia regiones específicas del genoma de un organismo. Los fragmentos amplificados con PCR son sometidos a restricción (corte) con endonucleasas, para posteriormente visualizar los fragmentos de restricción con métodos sencillos de tinción (bromuro de etidio o tinción con plata) en geles de agarosa o poliacrilamida. La combinación de PCR con RFLP es útil, pues permite detectar diferencias en secuencias de distintos individuos aprovechando la sensibilidad de PCR para amplificar regiones específicas de un genoma y la resolución de RFLP para comparar secuencias (Palacios *et al.*, 2010)

7.8 Ecología

Se han encontrado diferencias en la distribución geográfica de las 2 especies. *C. neoformans* es cosmopolita, mientras que *C. gattii* está restringido a regiones tropicales y subtropicales, entre las cuales se encuentran Australia, Brasil, Camboya, Hawaii, Sur de California, México, Paraguay, Tailandia, Vietnam, Nepal, Colombia y África Central (Mak, 2010). En estas áreas, *C. gattii* puede representar más del 35% de las cepas aisladas (Nardelli, 2005), también se pudo aislar *C. gattii* de los suelos dentro del rango de pH de 4,33-7,48, donde se asocia su presencia con menor contenido de humedad y menor contenido de carbono orgánico (Mak, 2010).

El hábitat más frecuente e importante de *C. neoformans* es el guano de lagunas aves como las palomas, pichones, gallinas etc., donde se ha llegado a obtener hasta en una 69%. Las palomas y diversas aves se convierten en reservorios o vectores indirectos del microorganismo, pero no adquieren la enfermedad, debido al estado inmune y a la temperatura corporal que es de 40 a 42°C, en la cual es poco virulento. El guano de las aves es, por lo regular, alcalino y tiene una gran cantidad de productos nitrogenados que mantiene viable al microorganismo hasta por varios meses (Bonifaz, 2012).

Los aislamientos ambientales de *C. gattii*, han indicado una estrecha relación de esta levadura con los eucaliptos (*E. camaldulensis*). Según los estudios realizados, se han determinado que la dispersión de *C. gattii* ocurre a finales de la primavera relacionado con la floración, es decir que este hongo está estrechamente relacionado con especies de angiospermas (Ellis, 1990).

La relación que presenta *Cryptococcus* con los árboles lo hacen mostrarse como un hongo epifito, es decir, que su reproducción está ligada al desarrollo y ciclo de vida de la planta, comprobando que este hongo completa su ciclo sexual durante

una asociación patogénica con diversas plantas. La degradación de productos arborícolas es debida a la lacasa, enzima muy frecuente en este hongo (Bonifaz, 2012).

Las especies de angiospermas de relevancia para este estudio serán: Eucalipto, Tulipán africano, Guayacán amarillo y rosado, la Acacia forrajera y Caucho sabanero.

7.8.1 Eucalipto (*Eucalyptus* sp.)

Los eucaliptos son originarios de Australia perteneciente a la familia Myrtaceae, este árbol crece hoy en la mayoría de las regiones del planeta gracias a su alta capacidad de adaptación a diferentes ecosistemas y a sus múltiples usos, tanto industriales como medicinales. El género eucalipto posee más de 600 especies, pero las tres más conocidas en el departamento de Cauca son: *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus cinérea* y *Eucalyptus globulus*, con un total de 232 árboles (Morales, 2007).

7.8.2 Tulipán africano (*Spathodea campanulata*)

El tulipán africano como su nombre lo indica es de origen africano, pertenece a la familia Bignoniaceae, obtiene su mejor desarrollo en las margas fértiles, profundas y bien drenadas, pero la especie no es particularmente exigente en cuanto a sitios. La textura del suelo puede variar entre arenas margosas hasta arcillas y el pH puede fluctuar entre 4.5 y 8.0. En la zona urbana se ha encontrado un total de 70 tulipanes (Francis, 1990).

7.8.3 Guayacán amarillo (*Tabebuia chrysanta*) y Guayacán rosado (*Tabebuia rosea*)

Especie originaria de América tropical desde México hasta Colombia y Venezuela. No es exigente de suelos, pero prefiere suelos de textura franca a franca arenosa, con buen drenaje interno y externo y un pH de 6 a 8.5. Su floración se caracteriza por presentarse de forma explosiva, es probable que todos los árboles de una región florezcan simultáneamente. En Colombia la floración y fructificación se presenta durante todo el año en diferentes localidades. En la zona urbana de la ciudad de Popayán se encontraron un total de 119 árboles (Quiroz, 1990).

7.8.4 Acacia forrajera (*Leucaena sp.*)

Especie perteneciente a la familia fabaceae. Es un árbol semicaducifolio, adaptado a una gran variedad de sitios en tierras bajas en el trópico y el subtrópico. El mejor crecimiento ocurre en suelos bien drenados que van de moderadamente alcalinos (pH de 7.5) hasta ligeramente ácidos (pH de 6.0). En la zona urbana de la ciudad de Popayán se han encontrado 38 árboles.

7.8.5 Caucho sabanero (*Ficus benjamina*)

Es una planta de la familia de las *Moraceae* con un uso creciente como planta ornamental de interiores. Como muchas de estas plantas, es de origen tropical, tiene abundante follaje y requiere pocos cuidados. *Ficus benjamina* es una planta de uso cada vez más frecuente como elemento decorativo en edificios públicos y domicilios, y se han identificado proteínas alergénicas de su látex. La ubicación habitual de estas plantas ornamentales en lugares secos y cálidos aumenta su transpiración, hecho que no ocurre en los países tropicales, de donde es originaria. En la zona urbana de la ciudad de Popayán se han encontrado 35 árboles (Gaig, 1999).

7. ANTECEDENTES

El primer aislamiento de *C. neoformans* fue realizado en 1894 por Sanfelice a partir de jugo de melocotón y de una lesión de tipo sarcomatosa, desde entonces ha sido fuertemente estudiado, aislándose por primera vez *C. gattii* en Australia en el año de 1990 a partir de *E. camaldulensis*, en medio natural (Rippon, 1998; Alvarado, 2008).

Rhoda Benham en 1935, fue la primera persona en dividir las dos variedades del *Cryptococcus neoformans*. Evans en 1949, estableció que pueden distinguirse tres serotipos, a los que denominó A, B, C, y los antígenos que determinaban estos serotipos estaban asociados con la cápsula polisacárida del hongo. Luego el investigador Chester E. Emmons, en 1951, realizó un importante aporte al descubrimiento en la epidemiología de *Cryptococcus neoformans*, al aislarlo de la tierra, de los nidos y heces de las palomas y gallinas (Levine et al., 1957). Walter en 1966, y Wilson en 1968, siguiendo el mismo procedimiento de Evans, describieron un cuarto serotipo el cual denominaron serotipo D. Kown-Chung y cols, encontraron que los tipos A y D eran similares entre sí, pero a la vez diferentes de los serotipos B y C esto llevó a que se reclasificaran las especies de *Cryptococcus neoformans* en dos variedades: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* para los serotipos A y D, y *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* para los serotipos B y C (Lema and Santos, 2011).

El complejo de hongos ha sido aislado en diferentes lugares del mundo, restringido a zonas tropicales o subtropicales (Quintero et al., 2005); como por ejemplo en la India, México, Columbia Británica, Perú, Colombia; concluyendo que la distribución de *Eucalypto* está relacionada con la distribución de los casos de Criptococosis humana causada por *C. neoformans* (Chakrabarti et al., 1997; firacative, 2011; Arguero, 1999).

Uno de los casos que más llamó la atención de la comunidad científica fue el brote de Criptococosis ocasionado por *Cryptococcus gattii* en la isla de Vancouver, British Columbia (BC), Canadá, el cual en el año de 1999, dio lugar a una de las mayores incidencias de esta infección en todo el mundo (Fyfe et al., 2008; Galanis y Macdougall, 2010; MacDougall et al., 2011).

En Colombia se han realizado múltiples estudios para determinar la presencia y distribución de la levadura en diferentes regiones del país, tales como Cúcuta y Cundinamarca, concluyendo que el almendro (*T. cappata*), podría ser un planta intermediaria para *C. gattii* y que esta variedad está presente en la zona durante todo el año, y debido a la baja tasa de recuperación de aislamientos, el nicho ambiental de *C. gattii* no se pudo establecer, generando la necesidad de realizar posteriores estudios (Castañeda et al., 1997; Firacative et al., 2011, Quintero et al., 2005). Lizarazo y colaboradores en el año 2000, realizaron un estudio para determinar las características clínicas de la Criptococosis ocasionada por *C. gattii*, concluyendo que esta se destaca por su severidad en la infección, así como su morbilidad y mortalidad, señalando la necesidad de un diagnóstico oportuno de la variedad infectante (Lizarazo et al., 2000).

En cuanto a los análisis moleculares se han realizado diferentes estudios para determinar cuáles son las técnicas más apropiadas de análisis para la levadura y el establecimiento de los serotipos presentes en las muestras analizadas, así como también la diversidad que presenta el hongo en general. Para tal objetivo se realizaron estudios para lograr la identificación de serotipos usando la técnica molecular PCR (Escandón & Montilla, 2010).

Frasés y colaboradores en Alicante, España (2009), realizaron la epidemiología molecular de los aislamientos del complejo *C. neoformans*, con el fin de ampliar información con respecto a la diversidad genética del complejo, arrojando como resultado la presencia de cinco genotipos mediante la amplificación y posterior restricción del gen URA5, un bajo poder discriminativo intra-especie y tres perfiles

moleculares con una buena correlación entre especies, variedades y genotipos, generándose cuatro agrupamientos principales relacionados con el origen de las levaduras (Frasés *et al.*, 2009).

8. OBJETIVOS

9.1 Objetivo general:

- Determinar la presencia y distribución del complejo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* en especies vegetales de la zona urbana de la ciudad de Popayán, Cauca.

9.2 Objetivos específicos:

- Determinar los posibles focos de infección del complejo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* mediante aislamientos ambientales en diferentes zonas de la ciudad de Popayán.
- Describir las variables ambientales que pueden favorecer el crecimiento del complejo de hongos.
- Caracterizar molecularmente cepas del complejo *C. neoformans* / *C. gattii* aisladas de muestras de especies vegetales de la zona urbana de la ciudad de Popayán, Cauca.

9. METODOLOGÍA

10.1 Área de estudio.

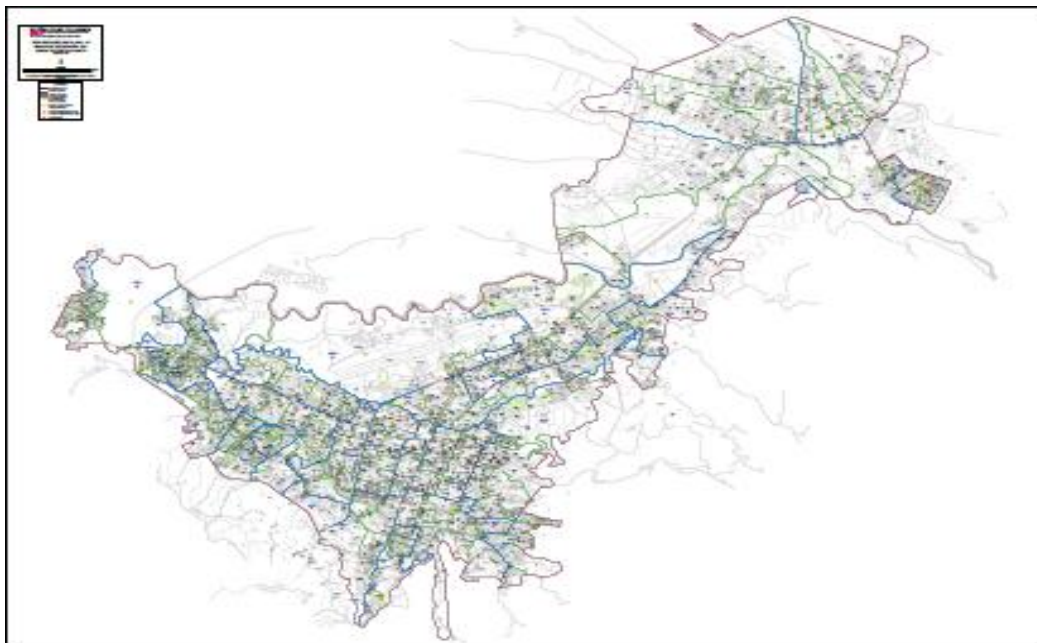


Foto 1: Área de estudio (Alcaldía de Popayán, <http://ambientechala.blogspot.com/>)

La ciudad de Popayán se encuentra ubicada en el departamento de Cauca, en la región sur-occidental del país, entre los 2° 26`39`` Norte y 76° 37` 17`` occidente, a una altura de 1700 y 1900 msnm, la temperatura del municipio oscila entre 12.3 y 25.7°C, con una media anual de 19°C, una precipitación anual de 2119.4mm con un promedio de días lluviosos entre 170 y 220, lo que genera que la humedad relativa de la zona alcance valores superiores al 72% (IDEAM).

10.2 Zonas de muestreo.

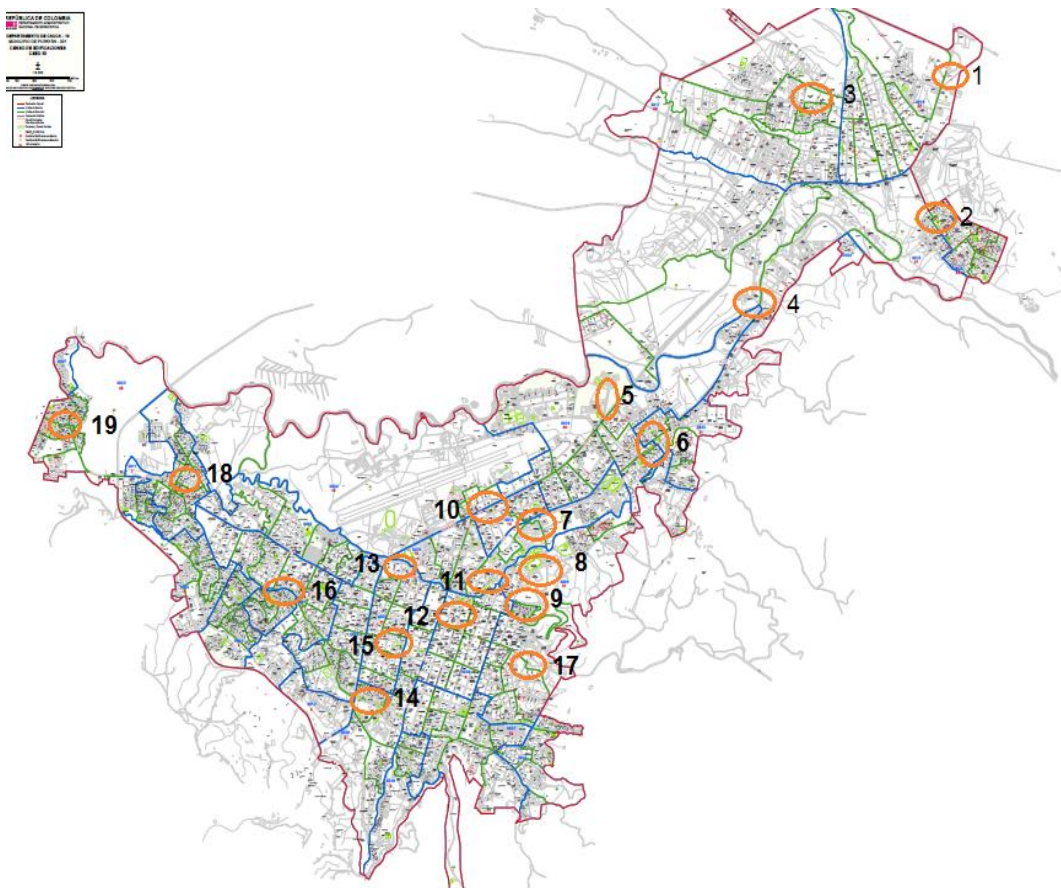


Foto 2: Mapa de zonas de muestreo.

1. Sendero De Eucaliptos; 2. Parque Central Barrio La Paz; 3. Entrada Seminario

LUGAR	N° DE ÁRBOLES	N° DE MUESTRAS OBTENIDAS
-------	---------------	--------------------------

Mayor; 4. Sendero Ecológico Villa Docente- Yambitará; 5. Facultad De Ciencias De La Salud; 6. Centro Deportivo Universitario Tulcán (CDU), 7. Facultad De Ingeniería Civil, 8. Facultad De Ciencias Exactas Y De Educación; 9. Morro De Tulcán, Pueblito Patojo; 10. Parque Carantanta; 11. Parque Mosquera; 12. Parque Caldas; 13. Sendero Ecológico El Cadillal; 14. Sendero Ecológico El Limonar; 15. Parque Benito Juárez; 16. Sendero Ecológico Tomás Cipriano; 17. Parque Santa Catalina Y Zonas Verdes; 18. Zonas Verdes Lomas De Granada. 19. Piedra norte.

10.3 Especies vegetales muestreadas.

Especies nativas empleadas para el estudio: Guayacán amarillo (*T. chrysanta*); Guayacán rosado (*T. rosea*); Acacia forrajera (*L. leucocephala*) y el Caucho sabanero (*Ficus sp.*).

Especies introducidas empleadas para el estudio: Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) y Tulipán africano (*S. campanulata*).

10.4 Intensidad de muestreo.

El muestreo se realizó 1 vez por semana durante seis meses, el método de muestreo fue aleatorio para así cubrir el área de estudio, para obtener una información no sesgada (Gysel y Lyon 1987 en Baquero, 2010). Durante el periodo de estudio, se hizo una referenciación geográfica de la zona y se tomaron datos como temperatura, la humedad relativa del sitio y la altura al nivel del mar con el GPS, para su posterior análisis (Firacative, 2011).

Los árboles de interés fueron censados por sector obteniendo lo siguiente:

Sendero de Eucaliptos	100	45
Parque La Paz, Parque Carantanta, Parque Mosquera, El seminario.	49	24
Sendero Ecológico Villa docente- Yambitara	23	15
Pueblito Patojo-El Morro	17	13
Parque Caldas y Puente del Humilladero	12	18
Sendero Ecológico El limonar	53	24
Parque Benito Juárez	11	6
Sendero Ecológico Tomás Cipriano	51	24
Parque José María Obando	13	6
Parque Santa Catalina	12	12
Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación	25	24
Facultad de Ingenierías	16	16
Centro Deportivo Universitario Y Facultad de Ciencias de la Salud	28	13
Lomas de Granada	26	27
Piedra Norte	40	27
Sendero Ecológico El Cadillal	35	30
TOTAL	494	339

Para un total de 494 árboles, de los cuales se muestrearon 112 árboles, para la obtención de 339 muestras.

10.5 Recolección de muestra.

Se recolectarán 10 gr de cada muestra vegetal por árbol, la muestra de detritus del suelo se recogerán con una pala cavando 10cm de profundidad, además muestras de ramas, tallo se cortarán y rasparán con un cuchillo para un fácil procesamiento, se tomarán también flores y frutos en caso de que el árbol se encuentre fértil, las muestras se colocarán de manera individual en bolsas plásticas con cierre hermético (Escandón, 2005). Los árboles muestreados se marcaron con pintura de aceite para poder identificarlos posteriormente.

10.6 Procesamiento de las muestras.

Se tomaron 5 g de la muestra en un tubo Falcón de 50 ml y se agregaron 25 ml de PBS estéril, se agitó constantemente durante 30 minutos, luego se filtró con una gasa estéril a un tubo Falcón de 15 ml y se adicionó 50 µl de la solución de antibióticos, se mezcló por inversión. Luego se sembró masivamente 100 µl en agar semilla de *Guizotia abyssinica*. Las cajas se incubaron a 28°C durante 20 días con observación cada 48 horas (Escandón, 2005).

10.7 Identificación por pruebas convencionales.

Las colonias de color café sugestivas de *C. neoformans/C. gattii*, se re-sembraron en agar glucosado de Sabouraud, luego se evaluó la producción de la enzima fenol oxidasa, ureasa y nitratos, y se les realizó la prueba de confirmación en medio de cultivo canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) (Escandón, 2005). Una vez las colonias se aislaron e identificaron, se crioconservaron en viales con glicerol al 10% y se guardaron a -70°C.

10.8 Medio agar bifenil-semilla para ave (*Guizotia abyssinica*).

Se trituraron 50g de las semillas de *Guizotia abyssinica*, se adicionó 1000ml de agua destilada, se hirvió por 30 minutos y se filtró con gasa. Se adicionó 1g de creatinina, 1g de KH_2PO_4 y 15g de agar bacteriológico y se calentó la mezcla hasta ebullición. Se esterilizó en autoclave 110°C por 15 minutos y se enfrió a 48°C, se adicionaron 25ml de bifenil, 2ml de cloranfenicol y 1ml de amikacina. Se mezcló suavemente y se sirvió en cajas de Petri plásticas (Escandón, 2005).

10.9 Determinación del patrón molecular.

El patrón molecular de los aislamientos ambientales se determinó mediante RFLP del gen *URA5* y PCR huella digital con el iniciador (GTG)₅

9.9.1 Extracción de ADN de alto peso molecular:

La extracción de ADN de los aislamientos se hizo empleando el método de extracción por alcoholes o choque térmico (Casali, 2003):

Se sembraron las cepas en medio YEPD. (Compuesto por 10 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 20g de glucosa 15g de agar), luego se pasaron las cepas en tubos ependorff con ayuda de un asa, se llevaron a -20°C por 1 hora.

Una vez transcurrido el tiempo requerido se agregó 500 μ L de buffer de lysis (5 g de SDS, 1.4g de NaCl, 1.73 g EDTA, 20 mL de Tris HCl 1M) y se llevó a vortex por 2min. Se incubó a 65°C por 1 hora. Después se agregó 500 μ L de fenol:cloroformo:isoamilico, y se llevó a vortex por 2min. Se centrifugó a 14000 rpm por 15min a 4°C. Se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se agregó 500 μ L de isopropanol. Luego se llevó la muestra a -20°C por 1 hora. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 15min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 500 μ L de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C, se descarta el sobrenadante y se dejó secar durante 2 horas. Se suspende el ADN en 50 μ L TE (Tris-EDTA) durante toda la noche a 4°C. Se guardó a -20°C.

9.9.2 Amplificación del gen orotidin monofosfato pirofosforilasa (OMPasa) llamado también *URA5*:

La determinación del patrón molecular de los aislamientos con la técnica de RFLP del gen *URA5* se hizo siguiendo el protocolo descrito por Meyer y colaboradores (2003) (Escandón *et al.*, 2005):

PCR del gen *URA5* se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L. Cada reacción contenía 500 ng de ADN, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de dNTPs, 3 mM de MgAC, 1,5 U de Taq polimerasa y 50 ng de cada cebador *URA5* (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') y SJ01 (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3'). La PCR se realizó en 35 ciclos en una Bio-Rad Thermal cycler (T 100), con 3 min de desnaturalización inicial a 94°C, 45 s de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a 62°C, 2 min de extensión a 72°C, seguido por un ciclo de extensión final por 6 min a 72°C. La amplificación de los productos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.4% (1.4 gr de agarosa, 100ml de TBE y 11 μ L de bromuro de etidio) a 100V durante 45 minutos usando un marcador molecular de 1000pb (SIGMA), y visualizados bajo luz ultravioleta. Una vez comprobada la presencia del gen se procedió a realizar la restricción por medio de enzimas

30 μ L del producto de la PCR se digirió doblemente con Sau96I (10 U / l) y HhaI (20 U / l) Se agregó una gota de aceite mineral estéril y se llevó a baño serológico a 35°C por 5 horas, luego se procedió a la separación de los productos por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% (2.5 gr de agarosa, 100ml de TBE 1M y 11 μ L de bromuro de etidio) a 30 voltios por 2 horas y 30 min y su posterior observación bajo luz UV. Los tipos moleculares (VNI-VNIV y VGI-VGIV) fueron asignados de acuerdo al patrón de bandeo.

9.9.3 PCR huella digital del ADN con el iniciador (GTG)₅:

La huella digital de los aislamientos se hará siguiendo el procedimiento descrito por Meyer y colaboradores (Meyer, 2003; Escandón, 2005):

El mini-satélite específico (GTG)₅ se empleó como único primer en la PCR. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ L, que contiene 10ng de ADN de alto peso molecular, 10mM de Tris-HCl, pH 8.3, 50mM de KCl, 1.5mM de MgCl. 0.2 mM de cada dNTPs, 3mM de MgAC, 30 ng de primer y 2.5U de Taq polimerasa. La PCR se realizó en 35 ciclos en una Bio-Rad Thermal cycler (T 100), con 20 s. de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a 50°C, 20 s. de extensión a 72°C, seguido por un ciclo de extensión final por 6 min a 72°C. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.4% (1.4 gr de agarosa, 100ml de TBE 1M, y 11 μ L de bromuro de etidio) a 80V durante 3 horas usando un marcador molecular de 1000pb (SIGMA), y visualizados bajo luz ultravioleta. Los tipos moleculares (VNI-VNIV y VGI-VGIV) fueron asignados de acuerdo al patrón de bandeo.

10.10 Instrumento Estructurado:

Mediante un instrumento estructurado se registraron los datos de colección de las muestras acopiadas en las salidas de campo. Estos datos hacen referencia a localización geográfica (GPS), temperatura ambiental (T°), humedad relativa (%H), altura al nivel del mar (msnm), los aislamientos recuperados, su patrón molecular y el tipo de material vegetal estudiado: hoja, corteza y suelo.

10.11 Análisis de datos:

Se realizó una base de datos de las variables evaluadas en el estudio. Las cuales se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 11.5. Se registraron las medidas de tendencia central y proporciones; con un análisis bivariado se determinó asociación entre las variables evaluadas y los aislados de *C. neoformans* / *Cryptococcus gattii* utilizando la prueba de R de Sperman.

10. RESULTADOS

11.1 Recolección de muestras:

Entre los meses de septiembre de 2012 y febrero de 2013 se obtuvieron 339 muestras de 19 zonas de la ciudad de Popayán que incluyen parques, senderos ecológicos y pasacalles. Las muestras fueron colectadas y procesadas de un total de 112 árboles de: Eucalipto, Guayacán, Acacias, Ficus y Tulipán africano (Tabla 1).

AREA	MUESTRAS POR ÁRBOL																	
	Eucalipto			Guayacán			Acacia			Ficus			Tulipán			TOTAL		
	Hoja	Corteza	Suelo	Hoja	Corteza	Suelo	Hoja	Corteza	Suelo	Hoja	Corteza	Suelo	Hoja	Corteza	Suelo			
Sendero de eucaliptos	15	15	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45		
Parque La Paz	0	0	0	6	6	6	0	0	0	3	3	3	0	0	0	27		
Entrada Seminario Mayor	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6		
Sendero Ecológico Villa docente	3	3	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	15		
Facultad de ciencias de la Salud	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	6		
Centro deportivo Universitario (CDU)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	6		
Facultad de ingeniería civil	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	16		
Facultad de Educación	1	1	1	5	5	5	1	1	1	0	0	0	1	1	1	24		
Pueblito Patojo: El Morro	1	1	1	0	0	0	4	2	2	0	0	0	0	0	0	11		
Parque Carantanta	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6		
Parque Mosquera	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3		
Parque Caldas	0	0	0	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18		
Sendero Ecológico el Cadillal	6	6	6	1	1	1	3	3	3	0	0	0	0	0	0	30		
Sendero Ecológico El Limonar	6	6	6	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	24		
Parque Benito Juárez	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6		
sendero ecológico Tomás Cipriano	4	4	4	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2	2	24		
Parque Santa Catalina	0	0	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12		
Lomas de Granada	1	1	1	3	3	3	0	0	0	2	2	2	3	3	3	27		
La Piedra Norte	8	8	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27		
Parque José María Obando	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	6		
TOTAL	47	47	47	39	39	39	10	7	7	6	6	6	13	13	13	339		

Tabla 1: Muestras Vegetales Recolectadas.

11.2 Aislamientos del complejo

Los resultados indican que *C. gattii* no se recuperó en la zona pero *C. neoformans* var. *grubii* estuvo presente en dos (10.53%) de los sitios estudiados (Sendero de Eucaliptos y la Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación de la Universidad del Cauca) (Tabla 2), con una recuperación ambiental de la levadura del 13.58%, correspondiente a 47 aislamientos. De cada muestra positiva se tomó más de un aislamiento para su posterior identificación. De los 47 aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii*, 39 se recuperaron de la corteza de eucalipto y 8 aislamientos de guayacán, 3 de la corteza y 5 del suelo (Anexo 1).

AREA	Muestras Positivas				
	Guayacán	Eucalipto	Acacia	Tulipán	Ficus
Sendero de eucaliptos	-	+	-	-	-
Parque La Paz	-	-	-	-	-
Entrada Seminario Mayor	-	-	-	-	-
Sendero Ecológico Villa docente	-	-	-	-	-
Facultad de ciencias de la Salud	-	-	-	-	-
Centro deportivo Universitario (CDU)	-	-	-	-	-
Facultad de ingeniería civil	-	-	-	-	-
Facultad de Educación	+	-	-	-	-
Pueblito Patojo; El Morro	-	-	-	-	-
Parque Carantanta	-	-	-	-	-
Parque Mosquera	-	-	-	-	-
Parque Caldas	-	-	-	-	-
Sendero Ecológico el Cadillal	-	-	-	-	-
Sendero Ecológico El Limonar	-	-	-	-	-
Parque Benito Juárez	-	-	-	-	-
sendero ecológico Tomás Cipriano	-	-	-	-	-
Parque Santa Catalina	-	-	-	-	-
Lomas de Granada	-	-	-	-	-
La Piedra Norte	-	-	-	-	-
Parque José María Obando	-	-	-	-	-

Tabla 2: Aislamientos positivos (+: presencia; -: ausencia).

La temperatura y la humedad promedio durante los meses de muestreo fue de 17.31°C, con un máximo de 24°C y un mínimo de 14°C y 67.62% con un máximo de 75% y un mínimo de 57% (Anexo 2). La asociación de las variables ambientales, el tipo de especie y el material vegetal respecto a los aislamientos recuperados, no presentó una asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$), según el análisis de regresión lineal general y la correlación de R de Spearman (Anexo 3).

11.3 Pruebas bioquímicas:

Las pruebas fenol-oxidasa, ureasa fueron positivas y negativas para CGB y nitratos (foto 6). Con lo anterior se concluye que estamos hablando del género *Cryptococcus* debido a que posee las enzimas fenol oxidasa y ureasa; y más específicamente a la especie *C. neoformans*, ya que esta es incapaz de utilizar la glicina presente en el medio CGB como única fuente de carbono, por tal razón no hay cambio de color en el medio.

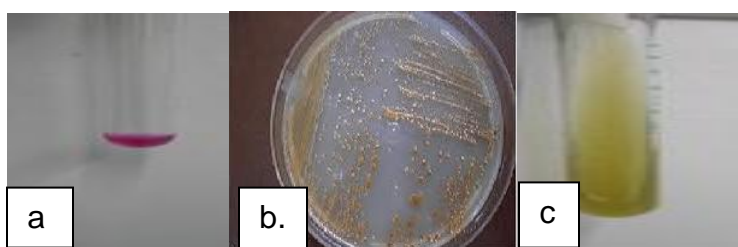


Foto 6: Pruebas bioquímicas: a. ureasa positiva, b. fenol-oxidasa positiva, c. CGB negativo.

Los códigos de los aislamientos asignados según la secuencia del cepario del Instituto Nacional de Salud son los siguientes (Tabla 3):

H0058-I-3682	H0058-I-3665	H0058-I-3663
H0058-I-3679	H0058-I-3667	H0058-I-3671

H0058-I-3672	H0058-I-3659	H0058-I-3683
H0058-I-3674	H0058-I-3690	H0058-I-3657
H0058-I-3686	H0058-I-3685	H0058-I-3668
H0058-I-3688	H0058-I-3687	H0058-I-3662
H0058-I-3691	H0058-I-3696	H0058-I-3693
H0058-I-3673	H0058-I-3714	H0058-I-4015
H0058-I-4012	H0058-I-4013	H0058-I-4014
H0058-I-3661	H0058-I-3675	H0058-I-3664
H0058-I-3681	H0058-I-3676	H0058-I-3660
H0058-I-3669	H0058-I-3677	H0058-I-3689
H0058-I-3666	H0058-I-3658	H0058-I-3692
H0058-I-3678	H0058-I-3680	

Tabla 1: Códigos de los aislamientos ambientales en el Instituto Nacional de Salud.

11.4 Tipificación molecular:

Las técnicas moleculares PCR huella digital y RFLP del gen URA5 arrojaron como resultado que los aislamientos recuperados pertenecen a *C. neoformans var. grubii* y al patrón molecular VNI, serotipo A.

PCR huella digital: Con esta técnica se obtuvo como resultado que los aislamientos ambientales corresponden al patrón molecular VNI, serotipo A, *C. neoformans var. grubii* (Meyer *et al.*, 2003)(Fotos 7-10).

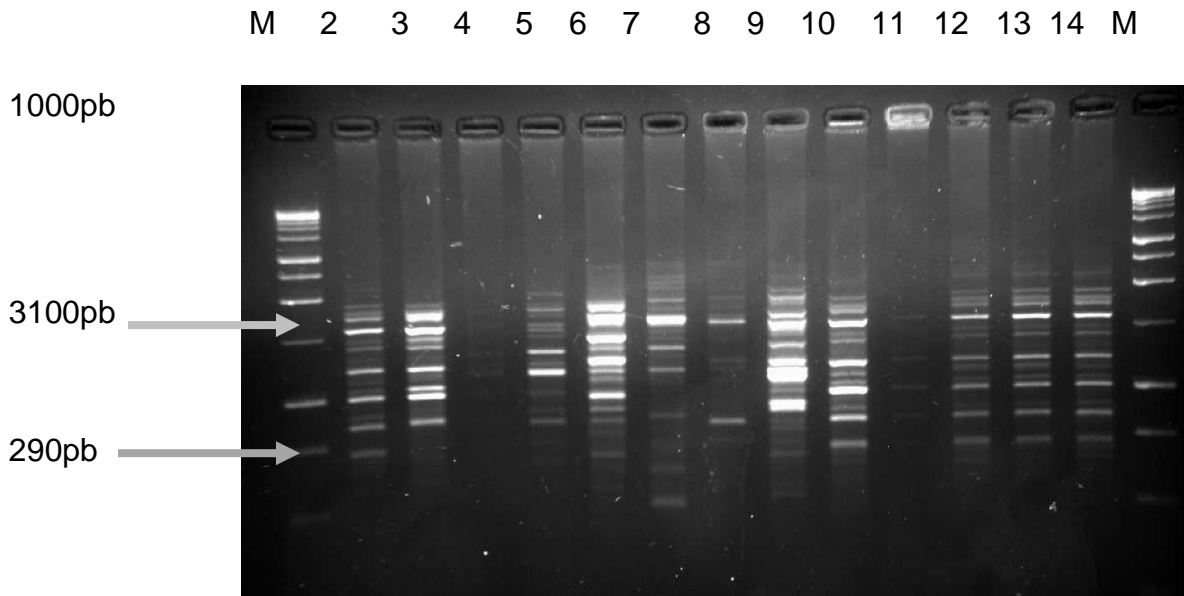


Foto 7: PCR huella digital: carril 1 y 15: marcador molecular de 1000pb (SIGMA), carril 2-5 patrón control VNI a VNIV, carril 6-9 patrón control VGI a VGIV, carril 10-14 aislamientos ambientales. Los aislamientos ambientales correspondieron al patrón molecular VNI (carril 2), según el bandeo obtenido.

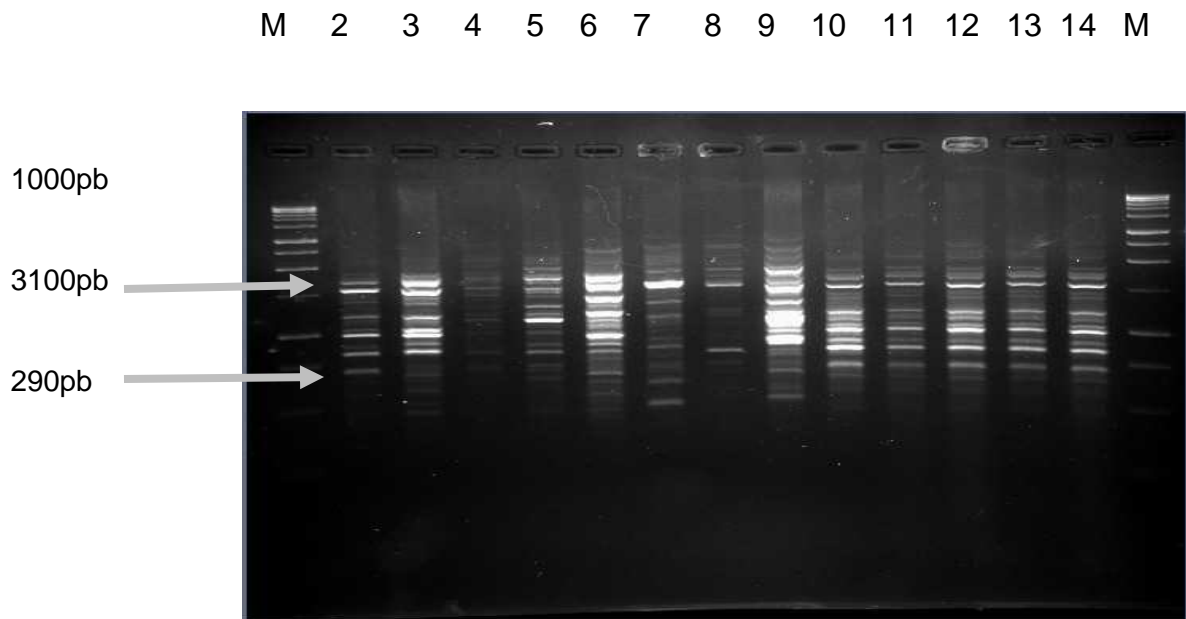


Foto 8: PCR huella digital: carril 1 y 15: marcador molecular de 1000pb (SIGMA), carril 2-5 control VNI-VNIV, carril 6-9 control VGI-VGIV, carril 10-14 aislamientos ambientales. Los aislamientos ambientales correspondieron al patrón molecular VNI (carril 2), según el bandeo obtenido.

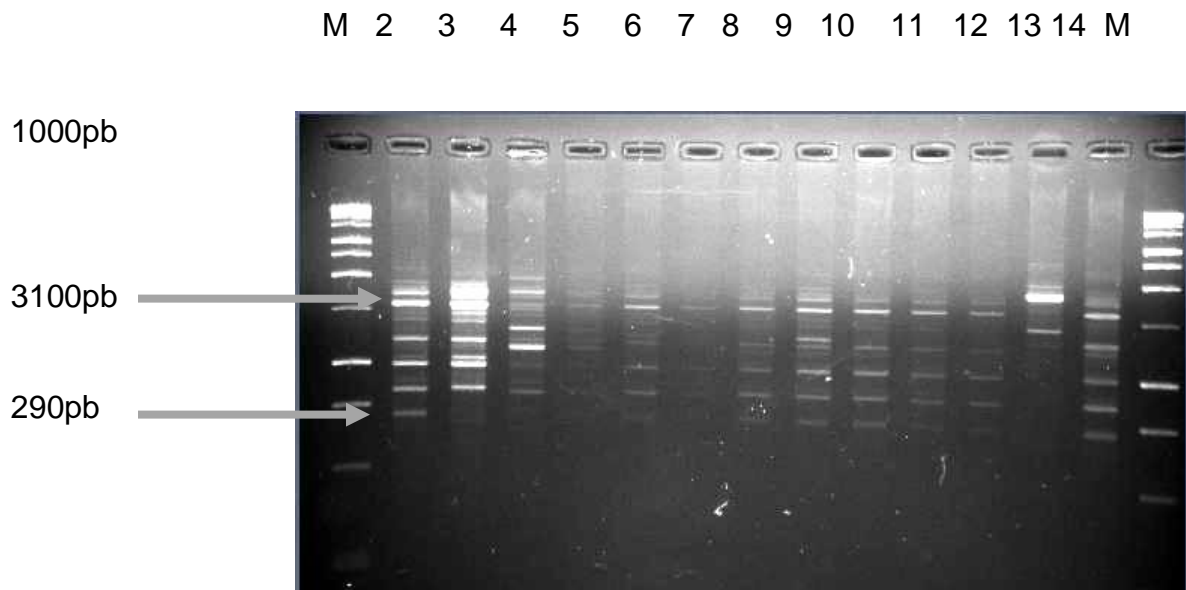


Foto 9: PCR huella digital: carril 1 y 15: marcador molecular de 1000pb (SIGMA), carril 2-5 control VNI-VNIV, carril 6-14 aislamientos ambientales. Los aislamientos ambientales correspondieron al patrón molecular VNI (carril 2), según el bandeo obtenido.

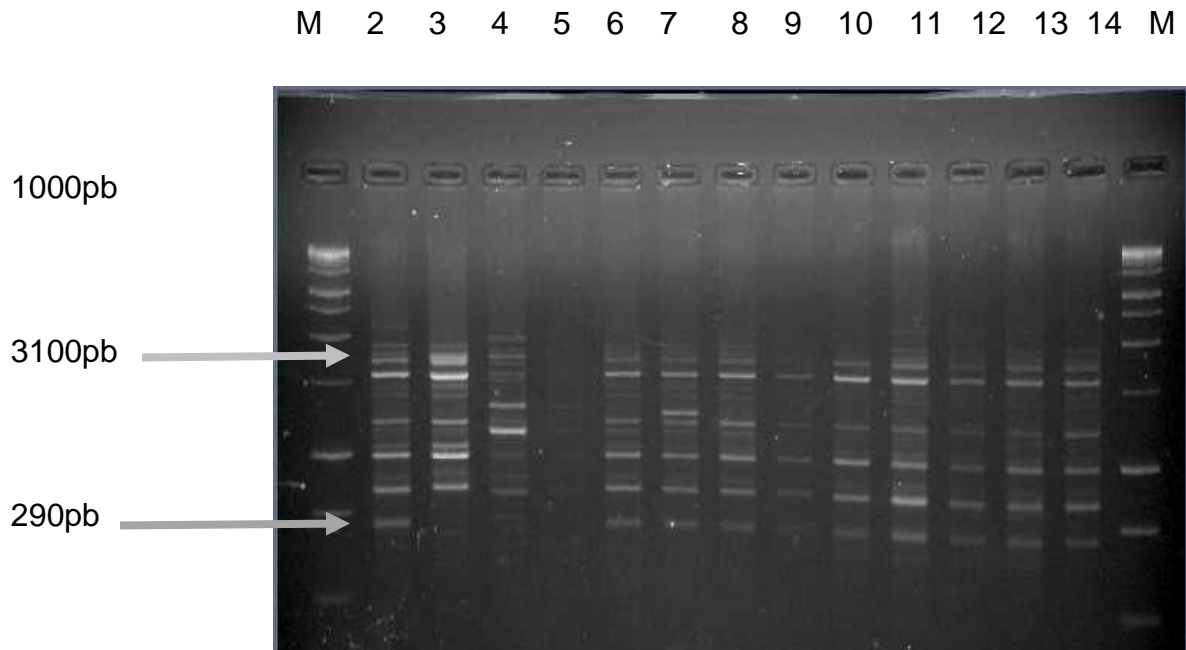


Foto 10: PCR huella digital: carril 1 y 15: marcador molecular de 1000pb (SIGMA), carril 2-5 control VNI a VNIV, carril 6-14 aislamientos ambientales. Los aislamientos ambientales correspondieron al patrón molecular VNI (carril 2), según el bandeo obtenido.

RFLP del gen URA5: para esta técnica se emplearon 500ng/uL de ADN; todos los aislamientos amplificaron el gen URA5 generando un fragmento de 779pb (foto 11).

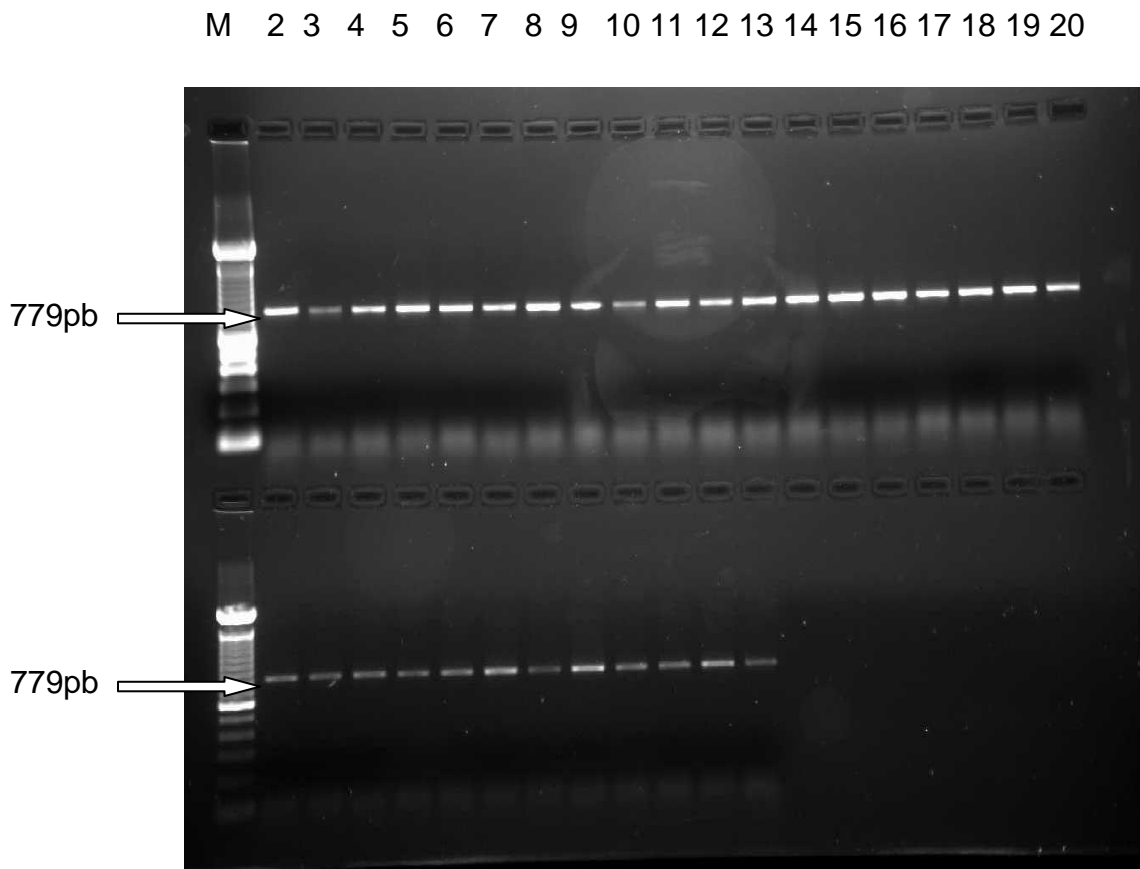


Foto 11: PCR del gen URA5: carril 1: marcador molecular de 1000pb (SIGMA) y en los siguientes los aislamientos ambientales, gen *URA5* amplificado.

La restricción del gen URA5, nos arrojó como resultado que el patrón molecular de los aislamientos es VNI, serotipo A, *C. neoformans var. grubii*, generando fragmentos de 100-500pb para el patrón molecular VNI (Meyer *et al.*, 2003; Frasés *et al.*, 2009) (Fotos 12 y 13).

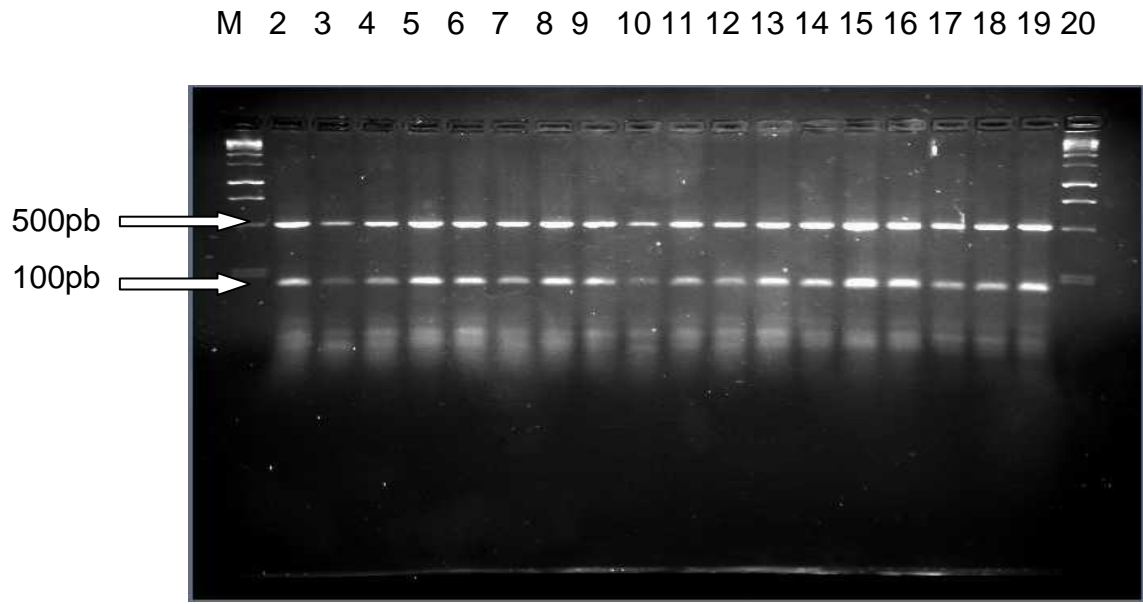


Foto 12: Restricción del gen URA5: carril 1 y 20: marcador molecular de 1000pb (SIGMA); carriles 2-19: aislamientos ambientales. Los patrones de bandeo corresponden al patrón molecular VNI (Meyer *et al.*, 2003; Frasés *et al.*, 2009).

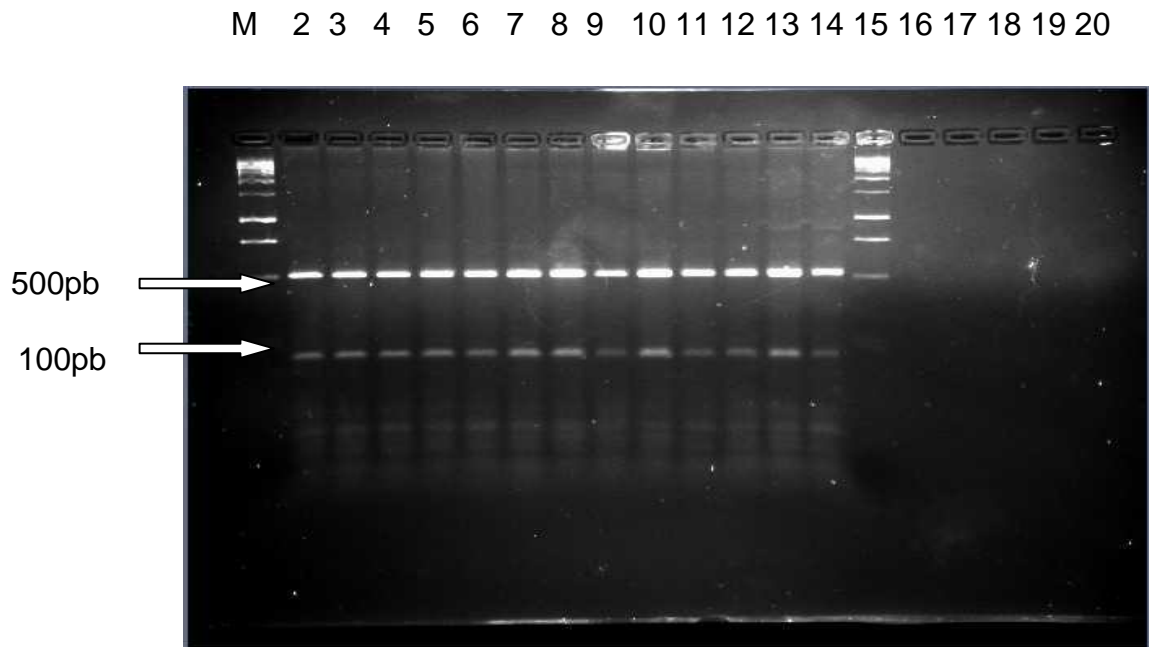


Foto 13: Restricción del gen URA5: carril 1 y 15: marcador molecular de 1000pb; carriles 2-14: aislamientos ambientales. Los patrones de bandeo corresponden al patrón molecular VNI VNI (Meyer *et al.*, 2003; Frases *et al.*, 2009).

.

12. DISCUSIÓN

El presente estudio se destaca como el primer informe del aislamiento ambiental del complejo *C. neoformans/C. gattii* en la ciudad de Popayán (Cauca), partiendo de un muestreo de diferentes especies vegetales realizado en 19 zonas verdes de la ciudad.

Respecto a los factores ambientales, la temperatura y la humedad promedio de los sitios donde se recuperaron los aislamientos fue de 17.3°C y 67.2% respectivamente, con una altura de 1760msnm, correspondiente a un piso térmico templado según la clasificación de Caldas (González, 2008). El estudio realizado por Quintero (2005) señala que estas condiciones no favorecen el crecimiento del hongo por el tiempo de radiación solar, concluyendo que el piso térmico frío con temperaturas entre los 12 y 18°C a alturas entre 2000 y 3000msnm, corresponde a las condiciones adecuadas para el establecimiento y la propagación ambiental del complejo *C. neoformans/ C. gattii*. En la isla de Vancouver en Columbia británica se presentó un brote de *C. gattii* a una temperatura promedio de 11°C y una humedad de 95%, constatando la preferencia del hongo hacia los climas fríos (Mak, 2010). Por otro lado, en un estudio realizado en Cúcuta, se logró aislar el complejo a una temperatura de 28.8°C y una humedad de 68% a una altitud de 320msnm (Firacative, 2011). Lo anterior sugiere que las condiciones ambientales adecuadas para la recuperación del complejo varían de región a región, aunque independientemente del piso térmico en el que se realice el estudio, la tendencia va a ser a que la tasa de recuperación aumente en los meses de lluvia, que presentan un alto porcentaje de humedad.

Los resultados de esta investigación exhiben que de los 41 aislamientos recuperados, 40 se obtuvieron de muestras de corteza, de eucaliptos y

guayacanes adultos, la cual estaba en proceso de descomposición. Esto se relaciona con un estudio reciente que logró determinar que el eucalipto no es el hábitat primario de *C. gattii* como se pensaba, pero la materia orgánica en descomposición como la madera y las oquedades de los árboles proporciona un sustrato favorable para la propagación de las levaduras (Halliday C. & Carter D., 2003).

Aunque no fue posible asociar los aislamientos con el tipo de material vegetal, debido a que la tasa de recuperación de la levadura fue baja, los resultados señalan que la corteza es la muestra que está albergando el hongo, por lo que se sugiere que ésta es uno de los principales embalses para la colonización del patógeno, a diferencia de lo encontrado en un estudio realizado en Cúcuta, en el que el principal hospedero del hongo es el suelo, lo que sugiere que puede estar interactuando con organizaciones de hospederos no vertebrados como los nematodos y la amebas (Firacative, 2011; Malliaris, 2004)

En cuanto a las pruebas bioquímicas, todos los aislamientos fueron fenol oxidasa y ureasa positiva, factores que se encuentran asociados a la cápsula y se consideran responsables de la capacidad virulenta de *Cryptococcus* (Alvarado, 2008). El complejo *C. neoformans* /*C. gattii* crece en un medio de cultivo selectivo llamado *Guizottia abyssinica*, el cual contiene compuestos difenólicos, que le confiere a la colonia un color marrón debido a la producción de la enzima fenol-oxidasa, encargada de producir la melanina ya que convierte los sustratos hidroxibenzoicos en pigmentos marrones (Baró, 2002). La habilidad de sintetizar melanina, es un marcador fenotípico, que diferencia *C. neoformans* de otra levaduras. A nivel molecular, se ha determinado que una delección del gen de la melanina disminuye la patogenicidad del hongo, en este caso, todos los aislamientos dieron melanina positivo (Zhu *et al.*, 2001).

Al igual q la fenol-oxidasa, la actividad de la ureasa se emplea rutinariamente para la identificación del hongo como factor de patogenicidad en el desarrollo de la Criptococosis, se ha descrito que la ureasa regula el pH para permitir el paso de la levadura a través de la barrera hematoencefalica, facilitando el establecimiento del hongo dentro de hospedero (Alvarado, 2008).

La prueba de CGB realizada a los aislamientos obtenidos, fueron negativos, es decir, que la especie encontrada correspondía a *C. neoformans* y no a *C. gattii*; debido a que el complejo *C. neoformans*/*C. gattii* tiene características bioquímicas diferentes, que permiten separar las dos especies, como por ejemplo, el metabolismo de la creatinina presente en el medio CGB (L-canavanina-glicina-azul de bromotimol). *C. gattii* puede utilizar la glicina como única fuente de nitrógeno a diferencia de *C. neoformans*, el empleo de creatinina y glicina produce una alcalinización del medio, generando un cambio de color de verde a azul por el indicador de pH azul de bromotimol.

El género *Cryptococcus* cuenta con al menos dos especies patógenas: *C. neoformans* con tres serotipos (A, D y AD) y *C. gattii* con dos serotipos (B y C). Este estudio arrojó como resultado que la especie presente en el medio ambiente de la ciudad de Popayán fue *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, correspondiente al patrón molecular VNI, hallazgos que están acorde con los resultados encontrados en otros estudios realizados en Colombia, en los cuales este tipo molecular fue el más frecuente en esta especie, siendo además el serotipo A el de mayor distribución a escala mundial y el de más fácil recuperación a partir de muestras ambientales (Quintero, 2005; Firacative, 2011).

La variedad *grubii* tiene una recuperación mundial y su hábitat se asocia con excrementos de algunas aves y detritos de árboles. En Colombia la frecuencia de los serotipos recuperados de pacientes con Criptococosis es similar a la informada a nivel mundial: serotipo A, 95%, serotipo B, 4.1%; serotipo D, 0.2% y serotipo C,

0.8%. (Escandón, 2005). Los datos obtenidos en esta investigación se asocian con los datos de la Secretaria Departamental de Salud, que reporta que de 23 casos de Criptococosis generados en el Cauca, 21 corresponden a *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A (comunicación personal Secretaria Departamental de Salud). Estos aislamientos permiten clarificar la incidencia de casos de criptococosis en la ciudad de Popayán, ya que se podrían relacionar con la exposición ambiental de estas personas al hongo, puesto que la infección se adquiere por la inhalación de las levaduras desecadas existentes en la naturaleza.

A pesar de que *C. neoformans* var. *grubii* está asociado a pacientes inmunosuprimidos, se han reportados casos de pacientes inmunocompetentes con Criptococosis ocasionada por esta especie y debido a que la Criptococosis es asintomática los primeros tres meses el establecimiento del hongo es más agresivo, ocasionando complicaciones mayores (Gupta, 2011).

13. CONCLUSIONES

- De 339 muestras obtenidas, se recuperó *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* en un 13.58% correspondientes a 41 aislamientos ambientales, corroborando la presencia del complejo en la zona.
- No se presentó una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del hongo y las variables ambientales.
- La caracterización molecular de los aislamientos arrojó como resultado que los aislamientos corresponde a *C. neoformans* var. *grubii*, con un patrón molecular que en su totalidad correspondió a VNI, serotipo A, confirmando esta especie como la más cosmopolita del complejo.
- Este estudio es el primer informe sobre el estado ambiental del complejo *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* en la zona urbana de la ciudad de Popayán, a partir de muestras vegetales.
- El aislamiento ambiental del hongo es un aporte a la clínica y epidemiología de la criptococosis en el Cauca.

14. RECOMENDACIONES

- Debido a la baja tasa de recuperación del hongo, este estudio muestra la importancia de seguir realizando muestreos ambientales para la recuperación del hongo en Popayán, donde se han reportado casos de Criptococosis sin tener un conocimiento de su origen.
- Realizar muestreos de otras fuentes ambientales como excretas de aves y madera en descomposición para determinar otras fuentes de propagación de la levadura.
- Es importante muestrear durante diferentes épocas del año, para de esa manera lograr encontrar una asociación entre las variables ambientales y la recuperación del hongo.
- Aumentar la vigilancia de la criptococosis en la ciudad por parte de las organizaciones de la salud, para de esa manera tener mayor información acerca de la infección.

15. BIBLIOGRAFIA

- Alvarado E. (2008). Estudio de los factores de patogenicidad de *Cryptococcus gattii*. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de genética y microbiología.
- Argüero B, Garza D, Flores V, Cervantes R. (1999). Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans var. gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. Rev Iberoam Micol.; 16:40-42.
- Arredondo C. (2006). *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas recolectadas en lugares públicos de la ciudad de Santiago, Chile. Universidad Iberoamericana de ciencia y Tecnología, Facultad de Medicina Veterinaria, Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago de Chile.
- Baquero J, Duque J, Gómez G. (2010). Composición florística en la sonadora, Calarcá, Quindío. Centro de estudios e investigaciones en biodiversidad y biotecnología-CIBUQ, Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia.
- Baró M. (2002). Epidemiología de la Criptococosis en España. Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de genética y microbiología.
- Bartlett K, Cheng P, Duncan C, Galanis E, Kidd S, Kuang-Lee M, Lester S, McDougall L, Mak S, Morshed M, Taylor J, Kronstad M. (2012) A decade of experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. Mycopathologia. 173(5-6):311-9.

- Bonifaz A (2012) Criptococosis. Micología médica básica. Cap 24. Edit. Mc Graw Hill.
- Bustamante B, Swinne D. (1998) Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii* en dos pacientes peruanos. Rev Iberoam Micol. 15: 22-24.
- Casali A, Goulart L, Rosa e Silva L, Ribeiro A, Amaral A, Alves S, Schrank A, Meyer W, Vainstein M. (2003) Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. Fems Yeast Res. 1559: 1-11.
- Castañeda A, Huérfano S, Rodríguez M, Castañeda E. (2001) Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendros. Biomédica. 21: 70-4.
- Castañeda A, McEwen J, Hidalgo M, Castañeda E (2004). Evaluación de varias técnicas de extracción de ADN de *Cryptococcus* spp. a partir de nuestra ambientales. Biomédica. 24: 324-31.
- Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye A.(1997) Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. Journal of Clinical Microbiology Vol. 35 N° 12, Dec. P. 3340-3342.
- Cortazar A, Silva E. (2004). Métodos Físico-Químicos en biotecnología: PCR. Universidad Autónoma de México
- Escandón P, De Bedout C, Lizarazo J, Agudelo CI, Tobón A, Bello S, Restrepo A., Castañeda, E. y el Grupo colombiano para el estudio de la criptococosis (2012). Cryptococcosis in Colombia: results of the national surveillance program for the years 2006-2010. Biomédica. 32 (3).

- Escandón P, Montilla A. (2010). Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*. Infectio 14(S2): S127-S130.
- Escandón P, Quintero E, Granados D, Huérfano S, Ruiz A, Castañeda E. (2005) Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus spp.* en Colombia. Biomédica. 25: 390-7.
- FIMUA Cryptococcosis Network. European confederation of medical mycology (ECMM). (2002) Prospective survey of cryptococcosis: report from Italy. Med Micol 507-17.
- Firacative C, Torres G, Rodríguez M, Escandón P (2011). First environmental isolation of *cryptococcus gattii* seritipo B, from Cúcuta, Colombia. Biomédica 31:118-23.
- Francis J. (1990) *Spathodea campanulata*, tulipán africano. SO-ITF-SM-32. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 5 p.
- Frasés S, Ferrer C, Sánchez M, Colom María. (2009) Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. Rev Iberoam Micol. 26(2): 112-117.
- Fyfe, M.; MacDougall, L.; Romney, M.; Starr, M.; Pearce, M.; Mak, S.; Mithani, S., and Kibsey, P. (2008) *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. *Canada communicable disease report = Releve des maladies transmissibles au Canada* 34, 1-12

- Gaig P, Bartolom B, Enrique E, Garca-Ortega P y Palacios R. (1999) Hipersensibilidad a *Ficus benjamina*. Unidad de Alergia. Hospital Universitari Joan XXIII. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona. Vol. 14, N.m. 4, pp. 212-217.
- Galanis, E., and Macdougall, L. (2010) Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerging infectious diseases* 16, 251-257
- González, M. (2008) Climatología, Programa de Ingeniería ambiental. Facultad de Ingeniería Civil. Universidad del Cauca.
- Gupta P, Malik S, Khare V, Banerjee G, Mehrotra A, Mehrotra S, Singh M. (2011) A fatal case of meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in an immunocompetent male. *J Infect Dev Ctries.* 5(1): 071-074.
- Halliday CL, Carter A. (2003) Clonal reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. *J Clin Microbiol*; 703-711.
- Harris J, Lockhart S, Chiller T. (2012) *Cryptococcus gattii*: where do we go from here? *Med Mycol.* 2012 Feb; 50(2):113-29.
- Kwon-Chung KJ. (1976) A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycology*, 68, 943-946.

- Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennet JE. (1987) Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 55: 1751-1754
- Levine S, Zimmerman H M, Scorza A. (1957) Experimental cryptococcosis (torulosis). *The American journal of pathology* **33**, 385-409
- Lema, Monica Lylion, and Santos, Luis Alberto (2011) *Cryptococcus Meningea* Vol. 2012
- Lizarazo J, Linares M, De Bedout C, Restrepo A, Agudelo C, Castañeda E, Grupo Colombiano para el estudio de la criptococosis. (2007) Estudio clínico y epidemiológico de la Criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica* 2007; 27: 94-109.
- Lizarazo J, Mendoza M, Palacios D, Vallejo A, Bustamante A, Ojeda E, Restrepo A, Castañeda E. (2000) Criptococosis ocasionada por *Cryptococcus neoformans var. gattii*. *Acta Medica Colombiana* Vol. 25 N° 4, julio-agosto.
- MacDougall, L.; Fyfe, M.; Romney, M. Starr, and Galanis, E. (2011) Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. *Emerging infectious diseases*.
- Mak S, Klinkenberg E, Bartlett K, Fyfe M. (2010) Ecological Niche Modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. *Environmental Health Perspectives*. 118: 653-8.

- Malliaris SD, Steembergen JN, Casadevall A. (2004) *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Med Mycol.* 42:149-58.
- Martín-Mazuelos E, Valverde A. (1999) Diagnóstico Microbiológico y Estudio de la Sensibilidad In Vitro. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Valme, Sevilla.
- Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huyah M, Castañeda E, Iberoamerican Cryptococcal study group. (2003) Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*; 9: 189-95.
- Mirza SA, Pelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME, et al. (2003) The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis*; 36: 789-94.
- Morales J, Galan F, Ramos D. (2007) El eucalipto, una especie polémica. Universidad iberoamericana, Ciudad de México. N° 22. Vol 2.
- Nardelli V, Pérez C, Mata S, Colella M, Roselló A, Hartung de Capriles C, Landaeta M, Olaizola C, Magaldi S. (2005) Identificación de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* usando el agar Staib sin creatinina. *Maracaibo Kásmara*. Vol. 33, N° 2.
- Palacios D, Chassin-Noira O. (2010). Simulación de la capacidad de DGGE y PCR-RFLP para detectar variación genética en secuencias de ADN. *Biológicas*. Vol. 12, No. 1.

- Parrotta, J. (1992) *Leucaena leucocephala*. SO-ITFSM- 52. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 8 p.
- Pumarola A, Rodríguez A, García J, Piédrola G. (1998) Microbiología y Parasitología Médica. Salvat editores, S.A. Barcelona. 2da edición. Pág. 779-789.
- Quiroz M, Chavarria M. (1990) Almacenamiento y Desarrollo de plantulas de catorce especies forestales nativas del pacífico seco de Costa Rica. Noticiero de Mejoramiento Genético y Semillas Forestales en América Central. Nº 5. 8-14.
- Quintero E, Castañeda E, Ruiz A. (2005) Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca, Colombia. Rev Iberoam Micol. 22:93-98.
- Rippon JM. (1998) The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes. Medical Mycology.
- Zhu X, Guibbons J, Garcia J, Casadevall A, Williamson P. (2001) Lacase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall associated virulence factor. Infect Immun. 69:5589-5596.

Recursos electrónicos:

- <http://ambientechala.blogspot.com/>.
- <http://institucional.ideam.gov.co/jsp/index.jsf>

16. ANEXOS

Anexo 1: Aislamientos recuperados de especies y material vegetal.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Hoja	99	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Corteza	99	,40	3,920	,394	-,38	1,19	0	40
Suelo	99	,01	,101	,010	-,01	,03	0	1
Fruto	4	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Flor	1	,00	0	0
Total	302	,14	2,245	,129	-,12	,39	0	41

Aislamientos positivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Eucalipto	132	,30	3,395	,295	-,29	,88	0	39
Guayacán	103	,02	,139	,014	-,01	,05	0	2
Acacia	15	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Ficus	12	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Tulipán	40	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Total	302	,14	2,245	,129	-,12	,39	0	41

Aislamientos positivos.

Anexo 2: Medidas de Tendencia Central de la Temperatura y Humedad.

		Temperatura (°C)	Humedad (%H)
N	Válidos	13	13
	Perdidos	1	1
Media		17,31	67,62
Mediana		17,00	70,00
Moda		17	70
Desv. típ.		3,119	6,212
Varianza		9,731	38,590
Mínimo		14	57
Máximo		24	75

Anexo 3: Asociación entre las Variables Ambientales, Especie y Tipo de Material Vegetal.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Aislamientos positivos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	38,932(a)	20	1,947	,370	,995
Intersección	,085	1	,085	,016	,899
Lugar	22,425	12	1,869	,355	,977
Especie	,020	4	,005	,001	1,000
Material	10,512	4	2,628	,499	,736
Error	1478,502	281	5,262		
Total	1523,000	302			
Total corregida	1517,434	301			

a R cuadrado = ,026 (R cuadrado corregida = -,044)

Correlaciones

			Aislamientos positivos	Temperatura (T°)	Humedad (%H)	Altitud (msnm)
Rho de Spearman	Aislamientos positivos	Coefficiente de correlación	1,000	,097	-,036	,020
		Sig. (bilateral)	.	,093	,536	,726
		N	302	302	302	302
	Temperatura (T°)	Coefficiente de correlación	,097	1,000	-,701(**)	,345(**)
		Sig. (bilateral)	,093	.	,000	,000
		N	302	302	302	302
	Humedad (%H)	Coefficiente de correlación	-,036	-,701(**)	1,000	-,545(**)
		Sig. (bilateral)	,536	,000	.	,000
		N	302	302	302	302
	Altitud (msnm)	Coefficiente de correlación	,020	,345(**)	-,545(**)	1,000
		Sig. (bilateral)	,726	,000	,000	.
		N	302	302	302	302

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).